



# Etude des mécanismes de régulation des canaux potassiques à deux domaines P

Magalie Tardy

## ► To cite this version:

Magalie Tardy. Etude des mécanismes de régulation des canaux potassiques à deux domaines P. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Nice Sophia Antipolis, 2010. Français. NNT : . tel-00508672

**HAL Id: tel-00508672**

**<https://theses.hal.science/tel-00508672>**

Submitted on 5 Aug 2010

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITE DE NICE SOPHIA-ANTIPOLIS - UFR Sciences**  
**Ecole doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé**

**THESE**

pour obtenir le titre de  
**Docteur en Sciences de la Vie**  
de l'UNIVERSITE de Nice-Sophia Antipolis  
Spécialité : Interactions moléculaires et cellulaires

Présentée et soutenue par

**Magalie TARDY**

**ETUDE DES MECANISMES DE REGULATION DES  
CANAUX POTASSIQUES A DEUX DOMAINES P**

**Thèse dirigée par Florian LESAGE**

Soutenue le 23 juillet 2010 à 14H  
Devant le jury composé de :

**Dr. Jacques BARHANIN**  
**Dr. Fabien TELL**  
**Dr. Michel VIVAUDOU**  
**Dr. Florian LESAGE**

**Président**  
**Rapporteur**  
**Rapporteur**  
**Examineur**



# **Etude des mécanismes de régulation des canaux potassiques à deux domaines P**

## **Résumé**

Les canaux potassiques forment la classe de canaux ioniques dont la diversité structurale et fonctionnelle est la plus grande. Trois grandes familles de canaux potassiques ont été identifiées, dont celle des canaux potassiques à deux domaines P, qui compte 15 membres. Ces canaux génèrent des courants « de fond », qui sont impliqués dans la régulation de l'excitabilité cellulaire et en particulier les épilepsies, l'anesthésie, la neuroprotection ou encore la dépression. Une étude approfondie des mécanismes régulant leur activité est nécessaire pour comprendre leurs rôles.

Nous avons étudié l'environnement protéique du canal TREK1 et nous avons montré l'existence d'une interaction entre le canal et une protéine cytosolique associée aux microtubules Mtap2. Cette association augmente l'expression du canal à la membrane plasmique sans en modifier les paramètres biophysiques. Cette protéine est la seconde protéine associée à TREK1 décrite. Toutes deux sont capables de se fixer simultanément sur le canal et d'additionner leurs effets plaçant ainsi le canal au cœur d'un complexe multiprotéique. Ces résultats montrent combien l'environnement protéique des canaux est important pour leur activité.

Nous avons aussi montré que le canal TWIK1 est localisé dans un compartiment subapical proche de la membrane plasmique. Il est en fait inséré dans la membrane puis très vite internalisé et envoyé dans les endosomes de recyclage. La sortie de ce compartiment et l'insertion à la membrane plasmique est déclenchée par l'activation de récepteurs couplés à la protéine G<sub>i</sub>. Cette activation serait le signal physiologique permettant d'accroître la quantité de canaux TWIK1 à la membrane plasmique.

**Mots clés :** canaux potassiques, protéines associées, régulation, TREK, TWIK, trafic intracellulaire





# **Investigations about regulation mechanisms of 2P domain potassium channels**

## **Abstract**

Potassium channels form the most diverse class of ion channel family. Three families of potassium channels have been identified, including the two P domain potassium channel family. This family is the last one identified and counts 15 members. These channels produce leak currents that play a key role in cellular excitability, and more particularly in seizures, anesthesia, neuroprotection or depression. A detailed study of the mechanisms regulating the channel activity is necessary for a better comprehension of their roles.

We studied the protein environment of the TREK1 channel and we showed that a cytosolic protein associated to microtubules, Mtap2, is able to bind TREK1. This association leads to an increase of TREK1 expression at the plasma membrane. This protein is the second identified. Both of them can bind TREK1 simultaneously and have additive effects, placing TREK1 at the center of a protein network. These results show how much the protein environment of channels is important for their activity.

We also showed that TWIK1 is localized in a subapical compartment near the plasma membrane. TWIK1 is actually inserted in the membrane then quickly internalized and addressed to the recycling endosomes. The export from this compartment is driven by activation of a Gi coupled receptor. This activation could be the physiological signal leading to an increase of TWIK1 currents at the plasma membrane.

Key words : potassium channels, associated proteins, regulation, TREK, TWIK, intracellular traffic

Institut de pharmacologie moléculaire et cellulaire  
CNRS UMR6097  
660 routes des lucioles  
06560 Valbonne



# TABLE DES MATIÈRES

<b>Table des matières .....</b>	<b>4</b>
<b>Liste des abbréviations .....</b>	<b>8</b>
<b>Liste des illustrations .....</b>	<b>11</b>
<b>Avant-propos.....</b>	<b>15</b>
<b>I Les canaux potassiques .....</b>	<b>19</b>
<b>I.1 Les courants potassiques .....</b>	<b>19</b>
I.1.1 Les courants potassiques dépendant du potentiel.....	19
I.1.1.1 Les courants potassiques à rectification retardée ( $I_D$ ) .....	19
I.1.1.2 Les courants potassiques transitoires ( $I_A$ ) .....	20
I.1.1.3 Les courants potassiques sensibles à la concentration interne de calcium ( $I_{BKCa}$ )	20
I.1.1.4 Le courant M ( $I_M$ ) .....	21
I.1.2 Les courants indépendant du potentiel .....	21
I.1.2.1 Les courants potassiques à rectification entrante ( $K_{ir}$ ).....	22
I.1.2.2 Les courants potassiques sensibles à la concentration intracellulaire de calcium	23
I.1.2.3 Les courants de fond de type GHK .....	23
<b>I.2 La structure des canaux potassiques, à l'origine de leur sélectivité..</b>	<b>24</b>
<b>I.3 Diversité des canaux potassiques .....</b>	<b>25</b>
I.3.1 Les canaux potassiques à 6 domaines transmembranaires.....	26
I.3.1.1 Les canaux dépendant du potentiel .....	26
a. Mécanismes d'activation et d'inactivation.....	26
b. La famille des $K_v$ .....	28
c. La famille éther-à-gogo ( <i>eag</i> ).....	28
d. La famille des $KCNQ$ .....	29
I.3.1.2 Les canaux sensibles à la concentration intracellulaire de calcium ....	30
I.3.2 Les canaux potassiques à 2 domaines transmembranaires.....	30



I.3.2.1	Les canaux à rectification entrante classique.....	31
I.3.2.2	Les canaux à rectification entrante inhibés par l'ATP ( $K_{ATP}$ ).....	31
I.3.2.3	Les canaux à rectification entrante activés par l'ATP.....	32
I.3.2.4	Les canaux à rectification entrante activés par les protéines G.....	32
I.3.3	Les canaux potassiques à 4 segments transmembranaires et 2 domaines P	33
I.3.3.1	Les canaux potassiques à 2 domaines P de mammifères.....	33
I.3.3.2	La sous-famille des canaux TASK1, TASK3 et TASK5.....	35
I.3.3.3	La sous-famille des canaux TASK2, TALK1 et TALK2.....	36
I.3.3.3	La sous-famille des canaux THIK1 et THIK2 .....	37
I.3.3.4	La sous-famille du canal TRESK.....	37
I.3.3.5	La sous famille des canaux TWIK1, TWIK2 et KCNK7 .....	38
a.	<i>Le canal TWIK1</i> .....	38
b.	<i>Le canal TWIK2</i> .....	43
c.	<i>Le canal KCNK7</i> .....	43
I.3.3.6	La sous-famille des canaux TREK1, TREK2 et TRAAK .....	44
a.	<i>Le canal TREK1</i> .....	44
b.	<i>Le canal TREK2</i> .....	53
c.	<i>Le canal TRAAK</i> .....	56
<b>II</b>	<b>Les protéines associées aux canaux potassiques.....</b>	<b>60</b>
II.1	Les protéines associées aux canaux potassiques à 6 segments transmembranaires .....	60
II.1.1	Les sous-unités $Kv_{\beta}$ .....	60
II.1.2	Les protéines à domaine PDZ .....	64
II.1.3	Les sous-unités auxiliaires des canaux $BK_{Ca}$ .....	67
II.1.4	Les sous-unités KChIP et DPPL.....	69
II.1.5	Les sous-unités KCNE .....	72
II.1.6	Les sous-unités silencieuses ou modulatrices .....	76
II.1.7	Autres protéines associées.....	77



a. <i>Lgi1</i> .....	77
b. <i>La calmoduline</i> .....	77
c. <i>Autres sous-unités associées</i> .....	78
<b>II.2 Les protéines associées aux canaux potassiques à 2 segments transmembranaires</b> .....	<b>79</b>
II.2.1 Régulation des canaux $K_{ATP}$ ( $Kir_{6.x}$ ) par les récepteurs aux sulphonylurés.....	79
II.2.2 Régulation des canaux GIRK ( $Kir_{3.x}$ ou $K_G$ ) par les protéines G.....	82
II.2.3 Localisation subcellulaire des canaux Kir grâce à l'interaction de protéines à domaine PDZ .....	85
II.2.4 Association de sous-unités Kir.....	90
a. <i>Cas du canal <math>Kir_{5.1}</math></i> .....	91
b. <i>Cas du canal <math>Kir_{3.1}</math></i> .....	92
c. <i>Cas du canal <math>Kir3.3</math></i> .....	93
II.2.5 Autres protéines partenaires .....	94
<b>II.3 Les protéines associées aux canaux potassiques à deux domaines P</b> 95	
II.3.1 Les protéines associées aux canaux TASK .....	95
II.3.2 Le canal TRESK et ses protéines associées .....	98
II.3.3 Le canal TWIK1 et ses protéines associées.....	99
II.3.4 Les protéines associées aux canaux TREK .....	100
a. <i>Interaction de TREK1 avec la protéine d'échafaudage AKAP-150</i> .....	100
b. <i>Interaction de TREK1 et la protéine prion <math>PrP^C</math></i> .....	101
c. <i>Interaction de TREK1 avec un peptide dérivé du récepteur à la neurotensine</i> .....	101
d. <i>Interaction de TREK1 avec une sous-unité du complexe de transport vésiculaire</i> .....	103
<b>III Résultats</b> .....	<b>105</b>
<b>III.1 La protéine Mtap2 est impliquée dans le trafic et l'expression du canal TREK1 (Article 1)</b> .....	<b>105</b>





III.2	Le silence du canal TWIK1 est expliqué par son endocytose constitutive et sa séquestration ( <i>Article 2</i> ) .....	112
III.3	La dépolarisation induite par le glucose dans les neurones de l'hypothalamus ne dépend pas des canaux potassiques à deux domaines P .....	118
IV	Discussion et perspectives .....	123
	Bibliographie .....	134



# LISTE DES ABBRÉVIATIONS

4-AP	4-Aminopyridine
5-HT	Sérotonine
ABC	ATP-binding cassette protein
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
ATP	Adénosine triphosphate
AHP	After hyperpolarisation
AKAP	A-kinase anchoring protein
AKR	Aldo-keto reductase
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AQ-2	Aquaporine 2
ARF6	ADP-ribosylation factor 6
ATP	Adénosine triphosphate
ATP	Adénosine triphosphate
CASK	Calcium/calmoduline dependent serine protéine kinase
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane regulator
COP	Coatomer protein complex
COS	CV-1 Origin SV40
CREB	cAMP response element binding
DHR	Disc large homology region
Dlg	Disc large region
DPPL	Dipeptidyl-peptidase like
DRG	Dorsal root ganglion
dSLIP	dSlo interacting protein
dSlo	drosophila Slowpoke
eag	éther-à-go-go
EB1	End-binding protein 1
EFA6	Exchange factot for ARF6
E <sub>K</sub>	Potentiel d'équilibre de l'ion K <sup>+</sup>
elk	eag-like K <sup>+</sup> channel
erg	eag-related gene
GABA	Acide γ aminobutyrique
GDP	Guanosine diphosphate
GHK	Goldman, Hodgkin et Huxley
GIRK	G protein activated inward rectifier K <sup>+</sup> channel
GTP	Guanosine triphosphate
HERG	Human ether-à-go-go gene



K <sub>2</sub> P	Canaux potassiques à deux domaines transmembranaires
K <sub>ATP</sub>	Canaux potassiques sensibles à l'ATP
KChIP	K <sup>+</sup> channel interacting protein
KCNE	K <sup>+</sup> voltage-gated channel subfamily member E
KCR <sub>1</sub>	K <sup>+</sup> channel regulator
KIF3	Kinesin superfamily protein 3
Kir	Canaux potassiques à rectification entrante
Kv	canaux potassiques dépendant du potentiel
Lgi1	Leucine-rich glioma inactivated gene
LTP	Long term potentiation
MAGI	Membrane associated guanylate kinase with inverted domain structure 1
MAGUK	Membrane associated guanylate kinase
MDCK	Madin darby canine kidney cells
Mink	Minimal K <sup>+</sup> channel protein
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NBD	Nucleotide Binding domain
NFAT	Nuclear factor of activated T cells
NGF	Nerve growth factor
NHERF	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> exchanger regulatory factor
NMDA	N-méthyl D-Aspartate
NTSR3	Neurotensine receptor 3
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidyl inositol diphosphate
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PP1	Protéine phosphatase 1
PrP	Protéine prion
PSD	Post-synaptic density
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
RGS	Regulator of G protein signaling
ROS	Reactive oxygen species
RVD	Regulatory volume decrease
SAP	Synapse associated protein
SGK1	Serum and glucocorticoid inducible kinase
SUMO	Small ubiquitin like modifier
SUR	Récepteurs aux sulphonylurés
T <sub>3</sub>	Triiodothyronine
T <sub>4</sub>	Tetraiodothyronine
TEA	Tetraéthylammonium
TIP-1	Tax interacting protein 1



TMD	Transmembrane domain
ZIP-1	PKC zeta-interacting protein 1
ZO-1	Zona occludens 1





# LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Transport de l'ion  $K^+$  et établissement du potentiel de repos des cellules animales.

Figure 2 : Les courants ioniques impliqués dans la genèse des potentiels d'action.

Figure 3 : Cinétiques d'activation, d'inactivation et de déactivation des canaux potassiques dépendant du potentiel.

Figure 4 : Courbes représentant l'intensité en fonction du voltage (I/V) des courants à rectification sortante et entrante.

Figure 5 : Les courants de fond de type GHK.

Figure 6 : Caractéristiques électrophysiologiques et profil pharmacologique des différents types de courants potassiques.

Figure 7 : Représentation schématique du canal Kcsa de la bactérie *Streptomyces lividans*.

Figure 8 : Diversité génique et structurale des canaux potassiques de mammifères.

Figure 9 : Les trois grandes classes structurales de canaux potassiques.

Figure 10 : Topologie membranaire des sous-unités potassiques à 6 segments transmembranaires et 1 boucle P dépendante du potentiel.

Figure 11 : Topologie membranaire des sous-unités potassiques  $BK_{Ca}$ , dépendantes du potentiel et sensibles aux concentrations extracellulaires de calcium.

Figure 12 : Topologie membranaire des sous-unités potassiques à 2 segments transmembranaires et 1 boucle P.

Figure 13 : Arbre phylogénétique des différentes sous-unités à 4 segments transmembranaires et 2 boucles P.

Figure 14 : Topologie membranaire et dimérisation des sous-unités potassiques à 4 segments transmembranaires et 2 boucles P.

Figure 15 : Expression des canaux TALK1 et TALK2 dans les cellules COS.

Figure 16 : Comparaison des courants TASK3 avec les courants théoriques de l'équation GHK.

Figure 17 : Sensibilité des canaux TASK aux variations de pH extracellulaire.

Figure 18 : Courants TWIK1 enregistrés dans des ovocytes de xénope.



Figure 19 : Localisation de TWIK1 dans le cerveau de souris adultes par hybridation in situ.

Figure 20 : Localisation de TWIK1 dans le tubule proximale de rein.

Figure 21 : Localisation subcellulaire de TWIK1 dans les cellules MDCK.

Figure 22 : Distribution de TREK1 dans le cerveau de souris adulte.

Figure 23 : Enregistrements des courants TREK1 exprimés dans des ovocytes de xénope et des cellules COS.

Figure 24 : Activation de TREK1 par l'étirement membranaire.

Figure 25 : Inhibition tonique de TREK1 par le cytosquelette.

Figure 26 : TREK1 modifie la morphologie des cellules qui l'expriment.

Figure 27 : Schéma représentant les principales régulations du canal TREK1.

Figure 28 : Effets de différents anesthésiques volatils sur les souris TREK1<sup>+/+</sup> et TREK1<sup>-/-</sup>.

Figure 29 : Rôle neuroprotecteur de TREK1.

Figure 30 : Distribution de TREK2 dans le cerveau de souris adulte.

Figure 31 : Propriétés biophysiques des courants TREK2.

Figure 32 : Activation de TREK2 par l'étirement membranaire et par l'acidification intracellulaire.

Figure 33 : Activation de TREK2 par les acides gras insaturés et le lysophosphatidylcholine.

Figure 34 : Diagramme représentant les domaines conservés des protéines de la famille Kv<sub>β</sub>.

Figure 35 : Représentation d'un complexe de quatre sous-unités α et quatre sous-unités β.

Figure 36 : Kv<sub>β1</sub> est responsable de l'inactivation rapide de Kv<sub>1.5</sub>.

Figure 37 : Structure tridimensionnelle du domaine PDZ3 de PSD-95.

Figure 38 : Diversité des protéines à domaine PDZ.

Figure 39 : Image de microscopie électronique d'une synapse.

Figure 40 : PSD-95 modifie la localisation de Kv<sub>1.4</sub> dans un système d'expression hétérologue.

Figure 41 : SGK1 et NHERF2 fonctionnent en synergie pour augmenter les courants Kv<sub>1.5</sub> dans les ovocytes de xénope.



Figure 42 : Diversité des sous-unités BK<sub>Caβ</sub> chez l'homme.

Figure 43 : Représentation schématique d'un canal BK<sub>Ca</sub> associé à sa sous-unité auxiliaire BK<sub>Caβ2</sub>.

Figure 44 : Diversité des sous-unités KChIP.

Figure 45 : Structure du complexe canal Kv<sub>4.3</sub>/KChIP<sub>1</sub>/DPP<sub>6</sub>.

Figure 46 : Diversité des sous-unités DPPL.

Figure 47 : Influence des sous-unités auxiliaires sur les propriétés du canal Kv<sub>4</sub>.

Figure 48 : Diversité des sous-unités KCNE humaines.

Figure 49 : Modèle structural du complexe Kv<sub>7.1</sub>/KCNE<sub>1</sub>.

Figure 50 : Modification des courants KCNQ<sub>1</sub> par les différentes sous-unités KCNE.

Figure 51 : Topologie membranaire et organisation du canal K<sub>ATP</sub>.

Figure 52 : Inhibition du courant K<sub>ATP</sub> par l'ATP.

Figure 53 : Stimulation de la sécrétion d'insuline dans les cellules β pancréatiques.

Figure 54 : Les récepteurs couplés aux protéines G.

Figure 55 : Représentation schématique de l'ouverture du canal Kir<sub>3.4</sub> en réponse à l'activation d'un récepteur couplé aux protéines G.

Figure 56 : Schéma décrivant la probable organisation du canal GIRK associé à une protéine G avant et après activation du récepteur.

Figure 57 : Le canal Kir<sub>2.3</sub> et ses signaux d'adressage.

Figure 58 : Schéma représentant l'interaction entre le complexe Lin-7/CASK et le canal Kir<sub>2.3</sub> à la membrane basolatérale.

Figure 59 : Le canal Kir<sub>5.1</sub>, non fonctionnel produit des courants lorsqu'il est co-exprimé avec PSD-95 dans les cellules KEK293.

Figure 60 : Modification des courants Kir<sub>4.1</sub> par la sous-unité Kir<sub>5.1</sub>.

Figure 61 : GIRK<sub>4</sub> (Kir<sub>3.4</sub>) s'associe à GIRK<sub>1</sub> (Kir<sub>3.1</sub>) et permet son adressage à la membrane plasmique dans les ovocytes de xénope.

Figure 62 : Schéma représentant la topologie du canal TASK1.



Figure 63 : La localisation des canaux TASK1 et TASK3 dépend de l'interaction de deux protéines :  $\beta$ COP et 14.3.3.

Figure 64 : Représentation schématique des différentes protéines partenaires interagissant directement avec le canal TREK.

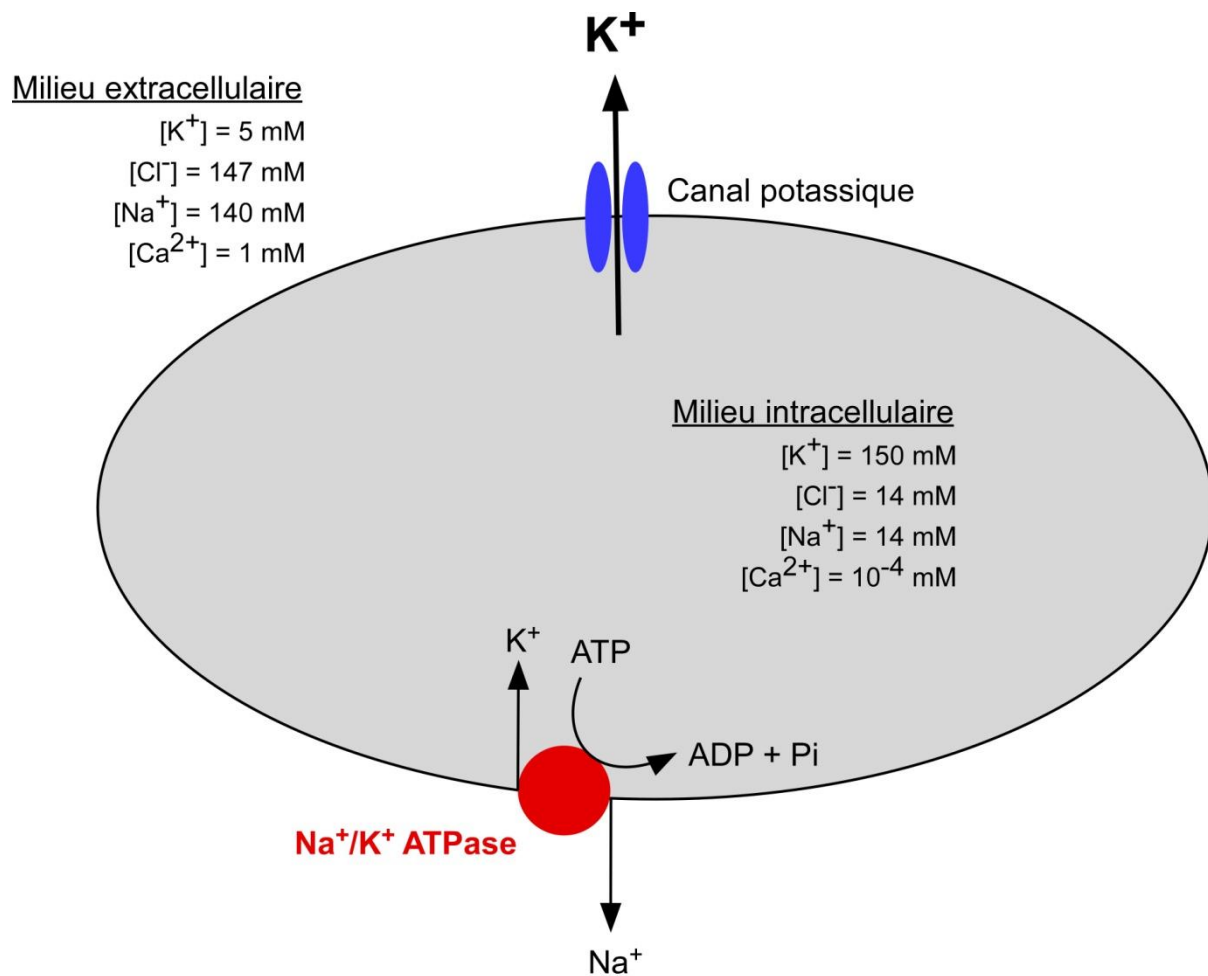
Figure 65 : Schéma représentant les effets de la liaison de la protéine d'échafaudage AKAP-150 sur les canaux TREK.

Figure 65 : Représentation schématique de la régulation du canal TREK1 par NTR3 et Spadin.

Figure 66 : Représentation schématique de la régulation du canal TREK1 par le NTR3 (Sortilin) et Spadin.

Figure 67 : Identification de nouveaux partenaires des canaux  $K_{2P}$ .





Equation de Nernst pour le potassium :

$$E_K = \frac{RT}{zF} \ln\left(\frac{[K^+]_{\text{ext}}}{[K^+]_{\text{int}}}\right)$$

R = constante des gaz parfaits

T = température en degré Kelvin

z = charge de l'ion

F = constante de Faraday

**Figure 1 : Transport de l'ion potassium et établissement du potentiel de repos des cellules animales.**

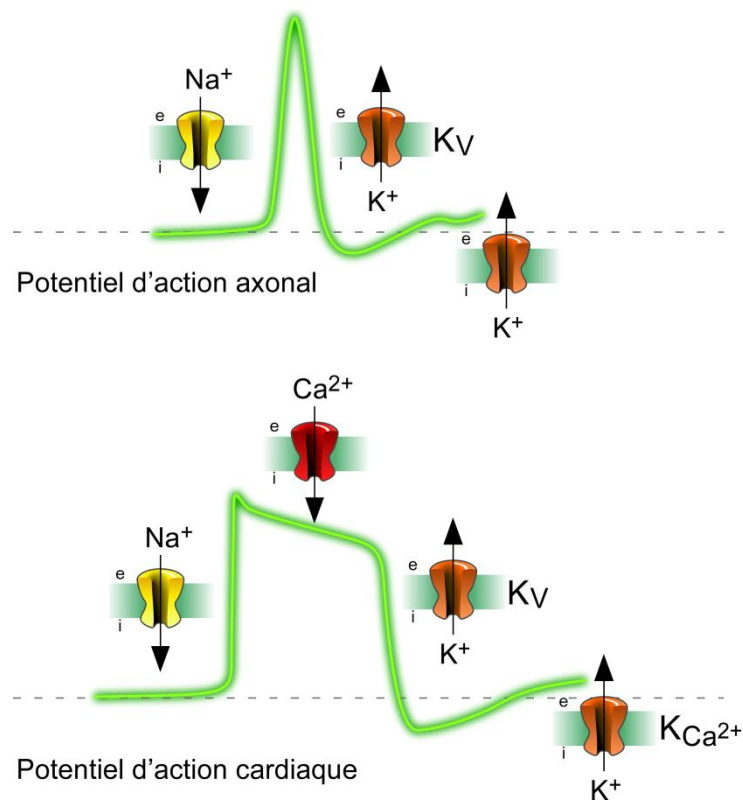
La pompe  $Na^+/K^+$  ATPase transporte les ions  $K^+$  à l'intérieur de la cellule grâce à l'hydrolyse de l'ATP, et est ainsi responsable de sa forte concentration intracellulaire. L'ion  $K^+$  sort de la cellule par l'intermédiaire des canaux ioniques selon son gradient électrochimique.

# AVANT-PROPOS

L'une des premières expériences d'électrophysiologie fut réalisée par Luigi Galvani à la fin du 18<sup>ème</sup> siècle, qui décrivit pour la première fois l'électricité animale, ou bioélectricité. Alors qu'il disséquait une patte de grenouille, il constata que le contact entre le métal de son scalpel et le nerf sciatique de l'animal provoquait des contractions musculaires. Il observa que la patte se contractait lorsque son nerf était mis en contact avec le muscle. Il prouva ainsi pour la première fois l'existence de courants électriques au sein des nerfs. Une étude systématique a ensuite montré que l'ensemble des nerfs et des muscles sont parcourus par un courant lorsqu'ils sont stimulés. Ce n'est que bien plus tard que les mécanismes cellulaires à l'origine de ces courants furent compris.

Les cellules constituant tout organisme sont isolées de leur environnement extérieur par une bicouche lipidique, appelée membrane plasmique. Celle-ci est une véritable barrière imperméable au passage des molécules chargées tels que les ions, qui ne peuvent alors traverser cette barrière hydrophobe que par l'intermédiaire de protéines. En 1902, Julius Bernstein (Bernstein, 1902) fut le premier à avancer l'hypothèse que les cellules possèdent une membrane permettant de séparer deux milieux de concentrations ioniques différentes. Selon lui la perméabilité sélective de cette dernière à certains ions est à l'origine du potentiel de repos des cellules. L'équation de Nernst (*Figure 1*) (Nernst, 1889) permet de déterminer le potentiel d'équilibre des différents ions, qui correspond au potentiel de membrane pour lequel le flux net d'un ion particulier est nul. Il appliqua cette équation et démontra que l'origine du potentiel de repos est la sélectivité de la membrane au potassium, et que le potentiel d'action, l'influx nerveux décrit par Galvani est causé par la perte de sélectivité transitoire au potassium.

Il faudra attendre le début des années 1950 pour qu'Andrew Hodgkin et Alan Huxley (Hodgkin and Katz, 1949) expliquent la nature et les mécanismes de la genèse et de la propagation du potentiel d'action dans les axones géants de calmar. Pour cela, ils développèrent la technique de "voltage clamp" ou potentiel imposé qui, comme son nom l'indique, consiste à enregistrer les courants ioniques transmembranaires globaux générés en réponse à un potentiel fixé expérimentalement. Ils définirent ainsi la chronologie des événements à l'origine du développement des potentiels d'action, qui ne sont possibles que grâce à la combinaison de plusieurs conductances ioniques (Hodgkin and Huxley, 1952). La phase ascendante (de dépolarisation) du potentiel d'action résulte d'une augmentation de la perméabilité membranaire aux ions sodium, tandis que la phase descendante (de repolarisation), qui lui succède est due à une augmentation de la perméabilité aux ions potassium (*Figure 2*).



**Figure 2 : Les courants ioniques impliqués dans la genèse des potentiels d'action.**

Les ions qui sont des substances hydrophiles évitent le contact avec la bicouche lipidique. Pour la traverser ils passent par des protéines de transport enchâssées dans la membrane plasmique, qui peuvent être de plusieurs types. Certaines, appelées pompes, utilisent de l'énergie pour déplacer les ions dans le sens inverse de leur diffusion passive. Ainsi elles assurent la mise en place de gradients ioniques en se servant de l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP. C'est le cas par exemple de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, une protéine membranaire avec une activité enzymatique qui maintient des concentrations intracellulaires faibles en sodium et élevées en potassium (*Figure 1*). La différence de concentration de part et d'autre de la membrane génère une énergie électrochimique qui est utilisée par la cellule pour transporter des ions à travers des structures membranaires particulières que l'on appelle canaux ioniques. Le transport d'ions par les canaux ioniques est un phénomène dit passif puisqu'il n'utilise pas directement d'énergie sous forme d'ATP.

La mise au point de la technique de "patch clamp" par Bert Neher et Erwin Sakmann au milieu des années 1970 (Neher and Sakmann, 1976) a constitué une avancée capitale dans l'étude des courants ioniques. Elle permet l'enregistrement unitaire de courants ioniques et fournit ainsi la preuve expérimentale de l'existence d'entités responsables des changements de perméabilité ioniques observés, les canaux ioniques. Cette technique révéla également l'extraordinaire diversité fonctionnelle des canaux ioniques en montrant qu'il existait trois grandes familles de canaux ioniques, basées sur leur sélectivité ionique : potassique, calcique ou sodique. Chaque canal ionique porte le nom de l'ion pour lequel il est le plus sélectif.

Au sein d'une même famille on distingua deux grands types de courants : les courants dépendant du potentiel et les courants indépendant du potentiel, dont l'activité est soit constitutive, soit déclenchée par des stimuli spécifiques.

Lors de l'ouverture de canaux sélectifs pour les ions potassium, la différence de concentration de cet ion chargé positivement crée un gradient chimique favorable à leur sortie. Ceci crée ainsi un déficit de charges positives à l'intérieur de la cellule appelée hyperpolarisation. Cette différence de charges produit un champ électrique. Progressivement l'accumulation de charges négatives à l'intérieur de la cellule s'oppose à la sortie du potassium. La sortie massive d'ions potassium continue jusqu'à ce que le gradient chimique favorable soit compensé par le gradient électrostatique défavorable. La différence de potentiel générée par cet équilibre peut être calculée par l'équation de Nernst (*Figure 1*).

Dans les conditions physiologiques où les concentrations de potassium sont de 150 mM à l'intérieur et de 5 mM à l'extérieur de la cellule, le potentiel d'équilibre de l'ion potassium est égal à -85 mV. Par leur activité les canaux potassiques amènent le potentiel de membrane de la cellule à un niveau proche du potentiel d'équilibre de l'ion. Dans de



nombreux types cellulaires, ce sont les canaux potassiques qui, en raison de leur activité prépondérante vis-à-vis des autres canaux ioniques, déterminent la valeur du potentiel de repos cellulaire. C'est pour cette raison que l'intérieur de la cellule est polarisé négativement au repos. A l'inverse, l'ouverture des canaux sélectifs pour le sodium ou le calcium, deux ions beaucoup plus concentrés à l'extérieur qu'à l'intérieur de la cellule, produit une entrée de ces ions chargés positivement dans la cellule, déplaçant le potentiel de membrane vers des valeurs positives, ce que l'on appelle dépolarisation. Les signaux électriques générés par ces gradients sont l'un des moyens mis en place par la cellule pour réguler son activité en réponse à différents types de stimuli. Ce fut ainsi la démonstration à l'échelle cellulaire de la bioélectricité décrite au 17<sup>ème</sup> siècle par Galvani.

Cependant, il fallu attendre l'avènement de la biologie moléculaire pour découvrir la structure des protéines à l'origine de ces courants. Numa fut ainsi le premier à cloner le canal sodique de l'organe électrique du poisson torpille au milieu des années 80 (Numa, 1987). Depuis, plus de 150 canaux ioniques différents ont été clonés, parmi lesquels les canaux potassiques représentent la famille la plus diversifiée. Depuis, et grâce aux progrès de la biologie moléculaire, nous savons que les canaux ioniques sont constitués par de gros complexes protéiques regroupant des sous-unités qui forment le pore, associées ou non à diverses sous-unités auxiliaires, dont la nature peut être très variable et dont le rôle est de réguler l'activité des canaux auxquels elles sont associées en modulant leur ouverture, leur pharmacologie, leur densité à la surface, ou encore leur stabilité.

Les canaux potassiques, en étant responsables de la phase de repolarisation, participent à la genèse des potentiels d'action neuronaux et cardiaques. Cependant les rôles physiologiques des canaux potassiques sont divers et ne se limitent pas à cela. Ils sont aussi à l'origine de nombreuses autres fonctions physiologiques.

L'expression des canaux clonés dans des systèmes d'expression hétérologues constitue une approche de choix pour déterminer leurs propriétés fonctionnelles, leurs régulations et leurs pharmacologies. Les canaux potassiques sont régulés par une incroyable variété de stimuli chimiques (pH, osmolarité, oxygène, anesthésiques), physiques (activité électrique, pression, température, lumière) et biologiques (ATP, calcium, protéine G, acides gras, kinases, phosphatases). Même si la corrélation entre les canaux recombinants et les canaux natifs est parfois délicate du fait de la différence d'environnement cellulaire de ces deux systèmes, cette approche a tout de même permis d'identifier les canaux dans leur environnement natif, une étape indispensable à la définition de leurs rôles physiologiques.



Dans les cellules excitables, l'activité de ces canaux joue un rôle important dans le contrôle de l'excitabilité membranaire ainsi que dans la génération et la fréquence des potentiels d'action. Le potentiel d'action est d'ailleurs la combinaison de plusieurs conductances ioniques et la composition en canaux ioniques d'une structure influence la forme et la durée du potentiel d'action. Cela explique la différence observée entre les potentiels d'action cardiaques et neuronaux (*Figure 2*).

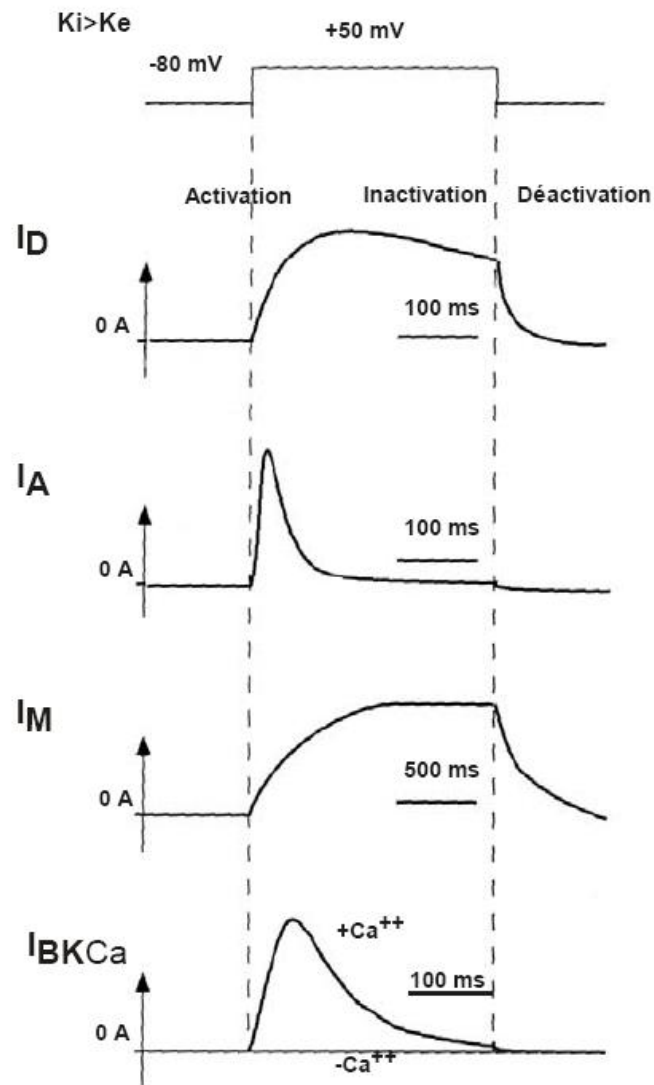
L'impact des canaux potassiques sur l'excitabilité membranaire est crucial et vient du fait que leur modulation a une incidence directe sur le potentiel de repos de la cellule. L'excitabilité cellulaire étant, dans le cas des neurones par exemple, déterminée par la différence entre le potentiel de membrane et le seuil de déclenchement des potentiels d'action. La fermeture de canaux potassiques entraîne une dépolarisation de la cellule qui deviendra alors plus excitable alors que leur ouverture va amener le potentiel de repos de la cellule vers des valeurs plus négatives, réduisant ainsi l'excitabilité.

Chez l'homme, les canaux potassiques, dont on retrouve des membres dans tous les tissus, ont ainsi été impliqués dans divers processus physiologiques tels que la transmission synaptique, la contraction musculaire, la mémoire, la sécrétion de neurotransmetteurs, la régulation du rythme cardiaque. Dans les cellules non excitables, les canaux potassiques sont impliqués dans le contrôle du volume cellulaire, la prolifération, la sécrétion d'hormones ou encore l'apoptose.

Mes travaux de thèse ont porté sur l'étude des mécanismes de régulation de quelques membres de la famille des canaux potassiques à deux domaines P ( $K_{2P}$ ). Je me suis plus particulièrement intéressée à la régulation des canaux TREK par une protéine associée, Mtap2, et aux mécanismes régulant la localisation subcellulaire du canal TWIK1.

Dans la première partie de ce manuscrit, je donnerai un aperçu de la diversité fonctionnelle et structurale des canaux potassiques. La seconde partie sera consacrée aux protéines qui interagissent de façon directe sur les canaux potassiques et qui représentent un facteur de régulation important. Je présenterai ensuite les études auxquelles j'ai participé pendant ma thèse.





**Figure 3 : Cinétiques d'activation, d'inactivation et de déactivation des canaux potassiques dépendant du potentiel.**

Ces enregistrements sont faits en condition physiologique :  $[K^+]_{int} > [K^+]_{ext}$ .

# I LES CANAUX POTASSIQUES

## I.1 LES COURANTS POTASSIQUES

Il existe une multitude de courants potassiques présentant des cinétiques, une pharmacologie et pour certains des seuils d'activation très variés. Il est cependant possible de distinguer deux grandes classes de courants potassiques à partir de leur sensibilité au potentiel de membrane : les courants dépendant du potentiel et les courants ne dépendant pas du potentiel de membrane.

### I.1.1 Les courants potassiques dépendant du potentiel

Les canaux à l'origine de ces courants sont en général complètement inactivés au potentiel de repos et ne s'ouvrent qu'à partir d'une certaine valeur de potentiel de membrane, que l'on appelle le seuil d'activation. Compte tenu du gradient électrochimique de l'ion potassium, l'ouverture de ces canaux va se traduire par une sortie massive de potassium qui entraîne le potentiel de membrane vers des valeurs négatives causant la repolarisation des cellules. Ces courants déterminent la forme, la durée et la fréquence des potentiels d'actions grâce à leur seuil d'activation qui se situe à des potentiels voisins de celui du seuil d'activation des potentiels d'action. Ces courants ont pour origine une grande diversité de canaux potassiques. Ils se distinguent par leurs propriétés électrophysiologiques (seuil d'activation, cinétique d'activation et d'inactivation) (*Figure 3*) et pharmacologiques. Il est à noter que la plupart de ces courants sont bloqués par le TEA (Tetraethylammonium) et à la 4-AP (4-aminopyridine), deux molécules chimiques.

#### *I.1.1.1 Les courants potassiques à rectification retardée ( $I_D$ )*

Hodgkin et Huxley furent les premiers à employer le terme de "delayed rectifier" pour décrire le courant potassique dépendant du potentiel qui se développe progressivement à la suite du courant sodique lors du déclenchement d'un potentiel d'action (Hodgkin and Huxley, 1952). Les courants  $I_D$  apparaissent après la phase ascendante des potentiels d'action et participent majoritairement à la phase de repolarisation. Ils contribuent également à la période réfractaire entre deux potentiels d'action grâce à leur



faible inactivation et influencent donc la fréquence des potentiels d'action. Ces courants sont insensibles au calcium intracellulaire.

#### *1.1.1.2 Les courants potassiques transitoires ( $I_A$ )*

Ces courants potassiques dépendant du potentiel s'activent par dépolarisation à des potentiels de membrane de l'ordre de -50 mV (Gola and Romey, 1971). Ils se distinguent des courants  $I_D$  par leurs cinétiques d'activation et d'inactivation qui sont toutes deux très rapides (quelques millisecondes), d'où leur nom de "courant transitoire". Pour lever l'inactivation de ces canaux et leur permettre de s'ouvrir à nouveau, une repolarisation du potentiel à une valeur inférieure à -50 mV est nécessaire.

Dans les neurones, les courants  $I_A$  ont pour conséquence de diminuer la fréquence des potentiels d'actions en ralentissant le retour au seuil d'activation des canaux sodiques. Ils ont donc un rôle de filtre des signaux excitateurs en retardant l'apparition du potentiel d'action (Debanne *et al.*, 1997).

#### *1.1.1.3 Les courants potassiques sensibles à la concentration interne de calcium ( $I_{BKCa}$ )*

L'ion calcium est un second messager utilisé par la grande majorité des cellules, où il intervient dans de nombreuses fonctions physiologiques. Les signaux calciques sont également détectés par des canaux potassiques, les canaux BK (pour BigK), encore appelés MaxiK en raison de leur grande conductance (100 à 300 pS) (Sah, 1996). Ces canaux sont activés par la dépolarisation quelle que soit la concentration intracellulaire de calcium. Cependant une élévation de la concentration de calcium intracellulaire déplace leur potentiel d'activation vers des valeurs plus négatives, rendant ainsi ce courant beaucoup plus sensible à une éventuelle dépolarisation. Ils s'activent donc très tôt à la suite d'un potentiel d'action et limitent l'entrée massive d'ions calcium qui peut être délétère. Ces canaux sont sensibles au TEA à faible concentration, à la charybdotoxine et l'ibérottoxine, qui sont deux toxines de scorpion.

Les courants  $I_{BKCa}$  participent à la repolarisation à la suite d'un potentiel d'action mais ils sont également à l'origine de la phase d'hyperpolarisation rapide qui suit (Sah and Faber, 2002). Cette phase d'hyperpolarisation limite la fréquence des potentiels d'action, c'est le phénomène de "spike-frequency adaptation". Il a pour rôle de limiter la stimulation d'un neurone en empêchant son potentiel de membrane d'atteindre de nouveau le seuil de déclenchement d'un potentiel d'action. Cette hyperpolarisation peut être décomposée en



trois phases : une phase rapide (fAHP pour fast AfterHyperPolarization) dans laquelle les courants  $I_{BKCa}$  sont impliqués, qui se développe immédiatement après le potentiel d'action, puis suit une phase intermédiaire (middleAHP) et une phase lente (slowAHP), qui peut persister plusieurs secondes.

#### *1.1.1.4 Le courant M ( $I_M$ )*

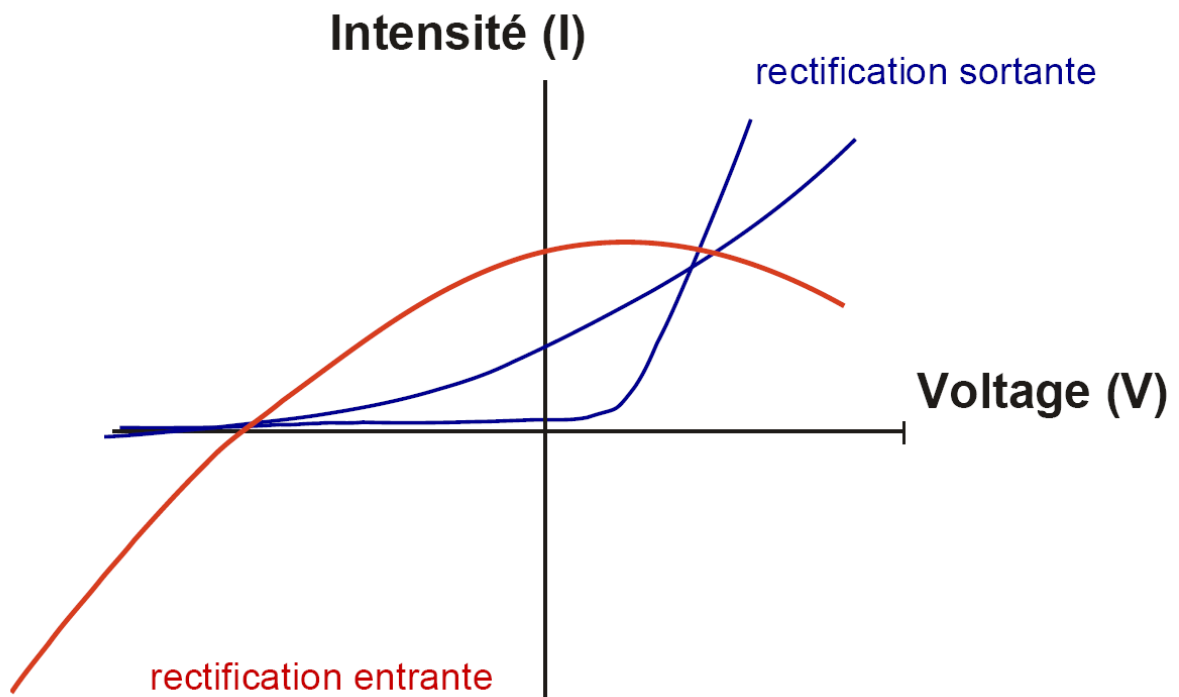
Ce courant est inhibé par l'activation d'un récepteur muscarinique, activé par l'acétylcholine et couplé aux protéines G, d'où son appellation de courant M. C'est un courant qui ne s'inactive pas et qui a un seuil d'activation voisin de -60 mV, donc proche du potentiel de membrane. Le groupe de Constanti qui a découvert ce courant a également montré qu'il est un frein qui contrôle l'excitabilité neuronale et limite le déclenchement de trains de potentiel d'action (Brown *et al.*, 1981). Son inhibition par la muscarine, une substance toxique extraite de champignon et agoniste des récepteurs muscariniques, entraîne une augmentation de l'excitabilité cellulaire (Marrion, 1997).

Le rôle du courant  $I_M$  est en quelque sorte analogue à celui décrit pour le courant  $I_A$ . Ces deux courants potassiques s'activent en dessous du seuil de déclenchement des potentiels d'action et peuvent donc les contrôler, d'une manière différente cependant. Les courants  $I_A$ , qui s'activent et s'inactivent très vite, retardent le déclenchement d'un potentiel d'action pendant les premières millisecondes de la stimulation dépolarisante, tandis que le courant  $I_M$ , qui s'active lentement et ne s'inactive pas, contrôle l'excitabilité de manière plus lente mais durable.

### 1.1.2 Les courants indépendant du potentiel

Contrairement aux courants dépendant du potentiel, ces courants ne présentent pas de cinétique d'activation et sont responsables du potentiel de repos. On distingue deux types de courants potassiques indépendant du potentiel :

- Les courants potassiques à rectification entrante, laissant plus facilement passer les ions potassium dans le sens entrant dans la cellule en conditions physiologiques.
- Les courants de fond qui sont ouverts à tous les potentiels de membrane.



**Figure 4 : Courbes représentant l'intensité en fonction du voltage (I/V) des courants à rectification sortante et entrante.**

Les courbes en bleu représentent un courant à rectification sortante : plus la membrane plasmique est dépolarisée plus l'intensité de l'efflux de potassium est important. La courbe rouge représente un courant à rectification entrante : plus la membrane plasmique est dépolarisée, plus l'efflux de potassium diminue.

### *1.1.2.1 Les courants potassiques à rectification entrante (Kir)*

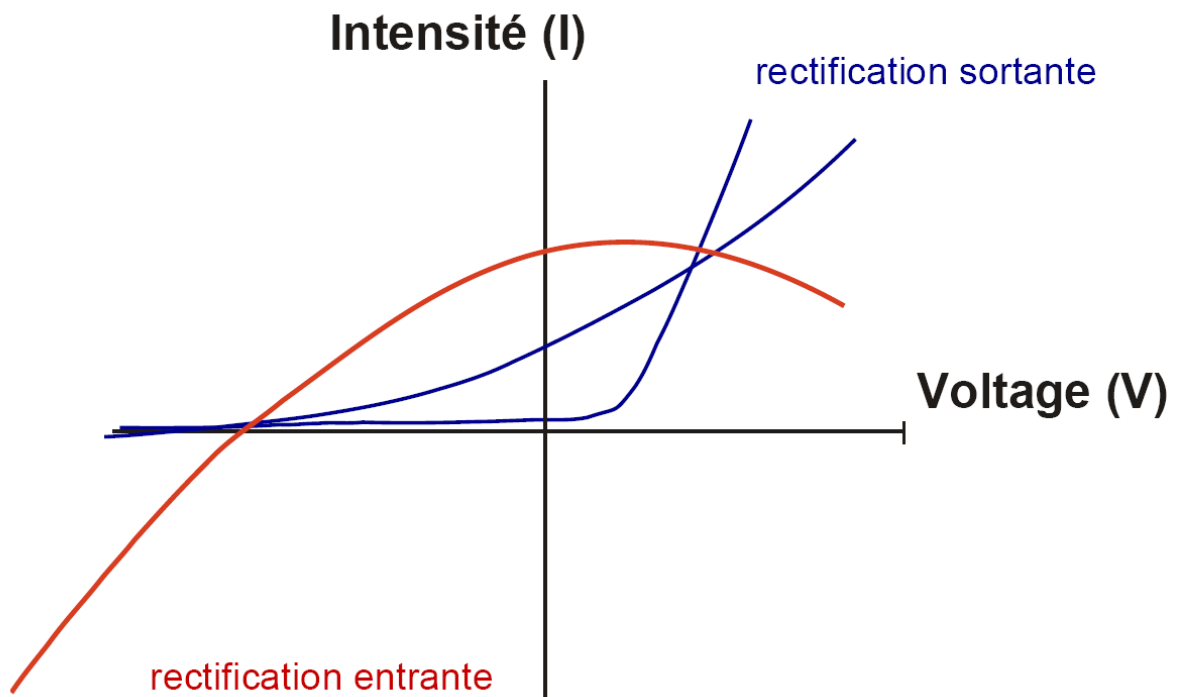
Ces courants ont été considérés au moment de leur découverte comme anormaux, en comparaison aux courants sortants générés par les canaux dépendant du potentiel (Katz, 1949).

Ces canaux n'ont pas de sensibilité propre au potentiel et n'ont pas de seuil d'activation (Nichols and Lopatin, 1997). Ils sont ouverts à tous les potentiels, mais leur conductance diminue lorsque le potentiel de membrane dépasse le potentiel d'équilibre de l'ion K<sup>+</sup> (E<sub>K</sub>), et augmente quand le potentiel de membrane est inférieur à E<sub>K</sub> (*Figure 4*). La rectification entrante est le résultat d'un blocage de haute affinité par des polyamines endogènes, notamment la spermine, ou par des ions magnésium, qui bouchent le pore du côté intracellulaire lorsque le potentiel de membrane est positif, résultant alors en une diminution des courants sortants (Lopatin and Nichols, 2001). Ces courants sont insensibles au TEA et à la 4-AP contrairement à la plupart des courants dépendant du potentiel.

Dans les conditions physiologiques, ce sont les courants sortants qui prédominent et qui participent ainsi à l'établissement et au maintien du potentiel de repos. Lors d'une dépolarisation, la rectification entrante permet de limiter l'efflux de potassium qui pourrait gêner le déclenchement des PA.

Ces courants ont été enregistrés dans de nombreux types cellulaires. Dans le cœur par exemple, un courant de ce type, appelé I<sub>K1</sub> contribue à l'établissement et au maintien du potentiel de repos, mais aussi à la phase de plateau du potentiel d'action cardiaque (Deal *et al.*, 1996). Un autre courant de ce type est présent dans les cellules β-pancréatiques où il joue un rôle fondamental dans la sécrétion d'insuline (Lazdunski *et al.*, 1994). Sensible aux variations du rapport de concentration ATP/ADP, il est inhibé par une hyperglycémie qui conduit à une augmentation de la concentration en ATP. L'inhibition de ce courant entraîne la dépolarisation de la cellule, puis l'entrée de calcium due à l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendant. L'augmentation intracellulaire de calcium qui en découle est à l'origine de la sécrétion d'insuline chargée de rétablir une glycémie normale. Ces courants jouent également un rôle neuroprotecteur au niveau neuronal, cardiaque et rétinien dans des conditions de stress métabolique telles que l'ischémie ou l'hypoxie (Cole *et al.*, 1991) (Escande and Caverio, 1992) (Ettaiche *et al.*, 2001).





**Figure 4 : Courbes représentant l'intensité en fonction du voltage (I/V) des courants à rectification sortante et entrante.**

Les courbes en bleu représentent un courant à rectification sortante : plus la membrane plasmique est dépolarisée plus l'intensité de l'efflux de potassium est important. La courbe rouge représente un courant à rectification entrante : plus la membrane plasmique est dépolarisée, plus l'efflux de potassium diminue.

### 1.1.2.2 Les courants potassiques sensibles à la concentration intracellulaire de calcium

A la différence des courants  $I_{BKCa}$  dont l'ouverture dépend du potentiel, les courants  $I_{IKCa}$  et  $I_{SKCa}$  sont indépendants du potentiel et ont une sensibilité au calcium plus forte (Vergara *et al.*, 1998).

Les canaux responsables des courants  $I_{IKCa}$  (Intermediate conductance) présentent une conductance intermédiaire (20-100 pS) par rapport à la conductance des courants  $I_{BKCa}$  (Big conductance) (Romey and Lazdunski, 1984). Les courants  $I_{SKCa}$  (Small conductance) sont générés par des canaux de faible conductance (2-20 pS) (Ishii *et al.*, 1997). Ces deux types de canaux sont activés par une élévation de la concentration intracellulaire en calcium et sont insensibles au TEA, contrairement aux canaux  $B_K$ . Les canaux  $S_K$  sont impliqués dans la phase lente de l'hyperpolarisation qui intervient à la suite d'un potentiel d'action (sAHP). Ces canaux sont également impliqués dans des phénomènes de plasticité synaptique et peuvent alors jouer un rôle dans les mécanismes de mémorisation et d'apprentissage (Sah and Faber, 2002).

### 1.1.2.3 Les courants de fond de type GHK

Les canaux responsables de ces courants ne présentent pas de seuil ou de cinétique d'activation. La plupart s'activent instantanément et aucun ne présente une inactivation. Ils ne répondent qu'à la loi de l'électrodifusion. Ces courants sont caractérisés par une courbe courant/potentiel à rectification sortante en présence de concentrations de potassium physiologiques ( $[K^+]_{ext} < [K^+]_{int}$ ). Cette rectification ne dépend pas du potentiel, comme cela est le cas pour les courants  $I_D$  ou  $I_A$ , mais résulte d'un gradient électrochimique défavorable pour les flux entrants. Elle disparaît, comme prédit par l'équation de Goldman, Hodgkin et Katz (GHK) (Goldman, 1943), lorsque les concentrations en potassium sont symétriques de part et d'autre de la membrane (Figure 5).

Les canaux responsables de ces courants sont actifs sur toute la gamme de potentiels de membrane et par conséquent entraînent le potentiel de repos des cellules à des valeurs proches de celle du potentiel d'équilibre de l'ion  $K^+$ . Du fait de leur insensibilité au potentiel et de leur rectification sortante, ils s'opposent également en permanence à l'effet excitateur produit par des courants entrants de  $Na^+$  et  $Ca^{2+}$ , en empêchant notamment le potentiel de membrane d'atteindre le seuil nécessaire à l'activation de ces canaux. Les courants de fond de type GHK sont insensibles aux bloqueurs classiques des canaux potassiques tels que le TEA, la 4-AP ou les toxines. En revanche, ils sont sensibles à une grande variété de stimuli, notamment des neurotransmetteurs, *via* leurs récepteurs couplés aux protéines G, ou

		Caractéristiques électrophysiologiques				Pharmacologie		Fonction
		Seuil d'activation (mV)	Temps d'activation (ms)	Temps d'inactivation (ms)	Conductance unitaire(pS)	Milieu externe	Milieu interne	Fonction
Dépendants du potentiel	$I_D$	-40 à -5mV	6 à 10	100 à >1000	3 à 40	TEA, $Cs^+$ , $Ba^{2+}$ , 4-AP, quinidine, DTX	TEA, $Cs^+$ , $Ba^{2+}$ , $Li^+$	Impliqué dans la phase de repolarisation d'un PA Module la fréquence des PA
	$I_A$	-55 à -40mV	3 à 40	30 à 40	5 à 38	TEA, DTX, 4-AP, Quinidine	TEA	Tend à s'opposer à l'activation des canaux sodiques Module la fréquence des PA
	$I_M$	-60 à -65mV	30, 300 et 3000	-	5 à 18	XE991, THA, TEA, 4-AP, Quinidine	TEA	Participe au contrôle l'excitabilité cellulaire
Indépendants du potentiel	$BK_{Ca}$	-80 (10 $\mu$ M $Ca^{2+}$ ) +200 (nM $Ca^{2+}$ )	14	< 100	200 à 400	TEA, CTX, $Cs^+$ , IBX	TEA, $Ba^{2+}$	Participe à la repolarisation et à la phase d'hyperpolarisation post-potentielle d'un PA Module la fréquence des PA
	$I_{Kir}$	ouverture constitutive ou régulée	-	-	5 à 90	TEA, $Cs^+$ , $Sr^{2+}$ , $Na^+$ , $Rb^+$ , $Ba^{2+}$	-	Participe au contrôle de l'excitabilité cellulaire
	$IK_{Ca}$	$\mu$ M $Ca^{2+}$	-	-	20 à 100	TEA, $Ba^{2+}$ , CTX, quinidine	-	Impliqué dans le maintien du potentiel de repos
	$SK_{Ca}$	$\mu$ M $Ca^{2+}$	-	-	2 à 20	Apamine, quinidine	-	Impliqué dans la phase d'hyperpolarisation post potentielle Module la fréquence des PA

**Figure 6 : Caractéristiques électrophysiologiques et profil pharmacologique des différents types de courants potassiques.**

Les courants générés par les canaux potassiques à deux domaines P ne sont pas représentés dans ce tableau. Les conductances unitaires sont mesurées en condition de potassium symétrique  $[K^+]_{int} = [K^+]_{ext}$ . DTX : dendrotoxine, IBX : ibériotoxine, CTX : charybdotoxine.

encore l'hypoxie (Buckler, 1997), l'acidose extracellulaire (Bayliss *et al.*, 2001), les acides gras polyinsaturés (Gnatenco *et al.*, 2002), ou les anesthésiques volatils (Washburn *et al.*, 2002). Par exemple, un courant de fond de type GHK contrôle le potentiel de repos des neurones granulaires du cervelet. Son inhibition par l'activation de récepteurs couplés aux protéines G dépolarise la membrane et favorise le déclenchement de potentiels d'actions (Watkins and Mathie, 1996) (*Figure 6*).

## I.2 LA STRUCTURE DES CANAUX POTASSIQUES, A L'ORIGINE DE LEUR SELECTIVITE

Une caractéristique essentielle des canaux potassiques est d'être mille fois plus sélectifs pour l'ion  $K^+$  que pour l'ion  $Na^+$  alors que ce dernier a une taille inférieure. Cette sélectivité est indispensable pour l'ensemble des différents processus physiologiques que sont l'excitabilité électrique neuronale, musculaire ou cardiaque, les sécrétions d'hormones ou de neurotransmetteurs ainsi que la prolifération, la différenciation ou la régulation du volume cellulaire.

Aujourd'hui, il est universellement admis que la boucle P, une séquence de 20 acides aminés présente dans la séquence de tous les canaux potassiques, est responsable de cette sélectivité. Ceci a été montré par plusieurs approches expérimentales notamment de constructions chimériques, où les domaines P des canaux  $KCNB_1$  et  $KCNC_3$  sont interchangeables, il est possible dans ce cas de transposer les conductances unitaires. De même, des expériences de mutagenèse dirigée ont montré que la boucle P impose au canal sa sélectivité ionique, sa conductance unitaire ainsi que sa sensibilité aux agents bloquants. Chaque boucle P est une séquence amphiphile d'une vingtaine d'acides aminés de nature très variable d'un canal potassique à un autre, qui fait un aller retour dans la membrane. Néanmoins il existe une séquence hautement conservée parmi tous les canaux potassiques, qu'ils soient dépendant du potentiel, activés par dépolarisation ou à rectification entrante. Cette séquence "signature" est constituée de 3 acides aminés Glycine-Tyrosine-Glycine (GYG) qui forment le filtre de sélectivité au potassium. La tyrosine du motif GYG peut cependant être remplacée par une phénylalanine ou par une leucine dans le second pore des canaux de la famille KCNK (Heginbotham *et al.*, 1994). La cristallographie du canal KcsA de *Streptomyces Lividans* a élucidé les mécanismes de sélectivité et de perméation du potassium (Doyle *et al.*, 1998). Ce canal de bactérie est un tétramère dont chaque sous-unité  $\alpha$  est formée de 2 segments transmembranaires ( $S_1$  et  $S_2$ ). Il présente peu d'homologie avec d'autres canaux potassiques excepté une boucle P qui contient la séquence signature de

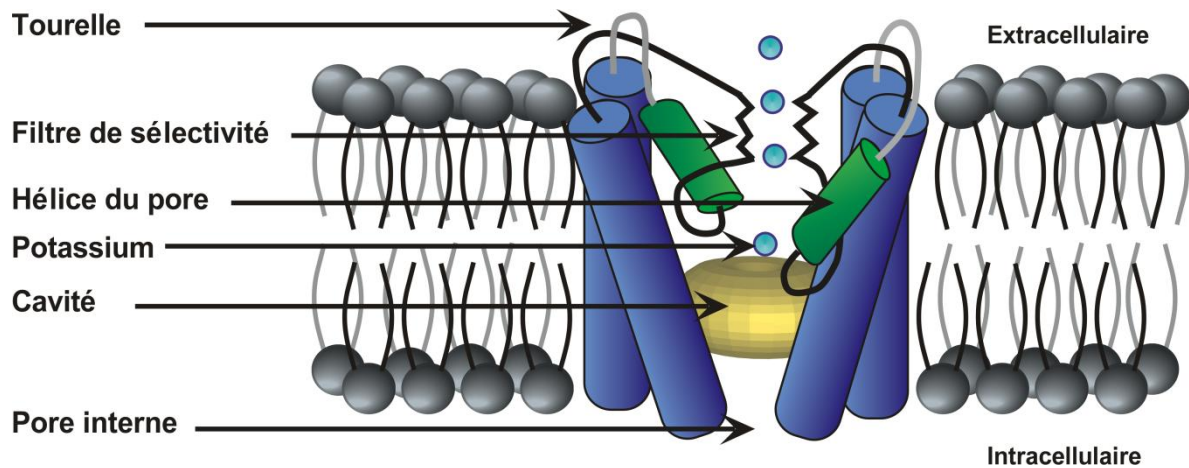


Figure 7 : Représentation schématique du canal Kcsa de la bactérie *Streptomyces lividans* (modifiée d'après Doyle et al., 1998).

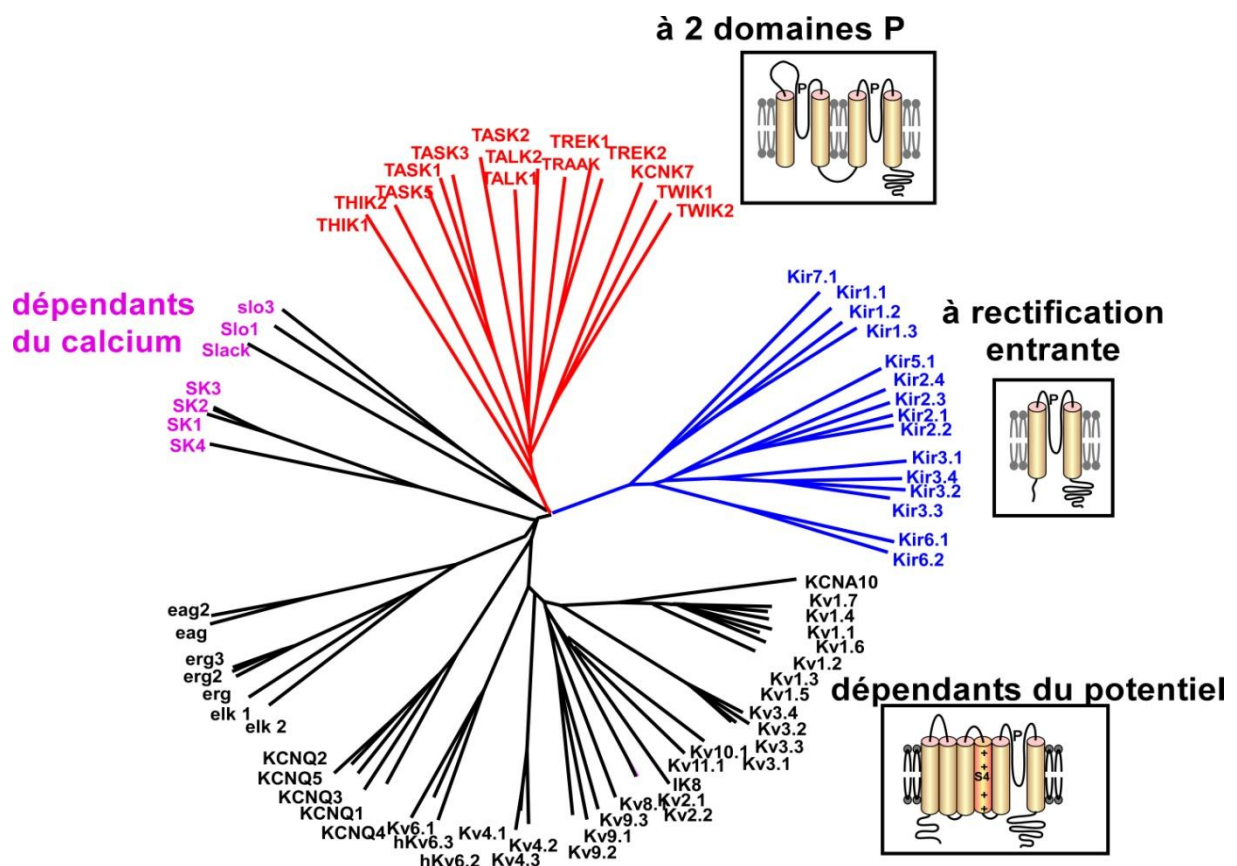


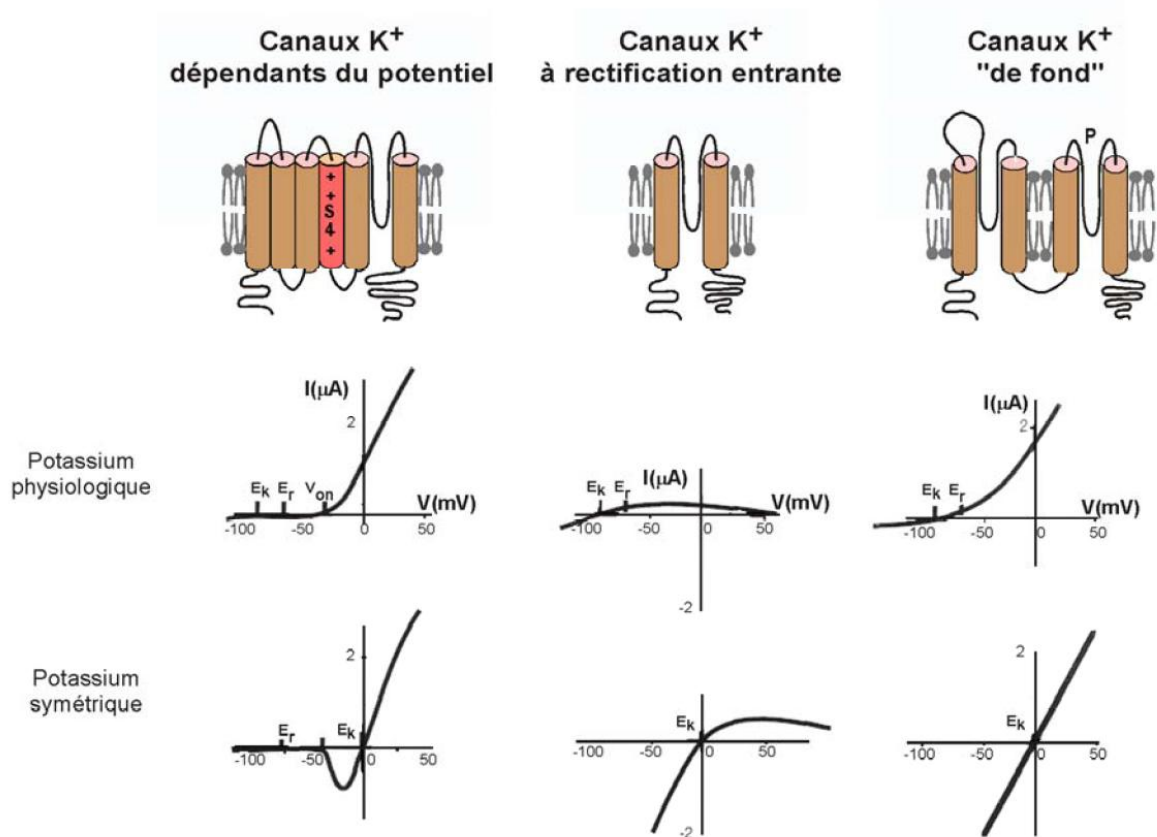
Figure 8 : Diversité génique et structurale des canaux potassiques de mammifères. Arbre phylogénétique des sous-unités potassiques de mammifères.

tous les canaux potassiques. Quatre sous-unités s'organisent de façon symétrique autour d'un pore central pour former une structure en forme de cône (ou de "tipi" inversé). Le domaine P qui relie les deux segments transmembranaires  $S_1$  et  $S_2$ , peut être décomposé en 3 compartiments : la tourelle, l'hélice du pore et le filtre de sélectivité (*Figure 7*).

La longueur totale du pore est de 4.5 nm. Les ions  $K^+$  qui pénètrent dans le pore sous une forme hydratée traversent d'abord un tunnel de 1.8 nm de long (le pore interne) avant d'atteindre une large cavité de 1 nm de diamètre située au centre de la membrane plasmique. A ce niveau, les résidus hydrophobes qui tapissent cette cavité ainsi que l'attraction électrostatique générée par les quatre hélices du pore pointant directement vers le centre de la cavité stabilisent les ions  $K^+$  dans leur forme hydratée, leur permettant de surpasser la barrière énergétique imposée par le centre de la bicouche lipidique (Roux and MacKinnon, 1999). Avant de rejoindre le milieu extracellulaire, les ions  $K^+$  passent par le filtre de sélectivité, canal très étroit de 0.35 nm de large, constitué d'un arrangement rigide de cinq groupes carbonyles très polaires fournis par les résidus T-V-G-Y-G. Le passage au travers de ce filtre n'est possible que pour l'ion  $K^+$  partiellement déshydraté (Zhou *et al.*, 2001). La stabilisation de l'ion  $K^+$  sous forme déshydratée est réalisée par les oxygènes des liaisons peptidiques qui, en quelque sorte miment les oxygènes des molécules d'eau. Cette structure est suffisamment rigide pour que les ions plus petits, tels que le sodium, ne puissent pas être stabilisés sous une forme déshydratée, leur forme hydratée étant trop volumineuse pour traverser le filtre. Deux ions  $K^+$  déshydratés occupent en même temps le filtre de sélectivité, la répulsion électrostatique entraîne leur localisation aux extrémités opposées du filtre (Morais-Cabral *et al.*, 2001). Lorsqu'un troisième ion  $K^+$  arrive à la base du filtre, il provoque l'expulsion dans le milieu extracellulaire de l'ion situé au sommet du filtre par répulsion électrostatique.

### I.3 DIVERSITE DES CANAUX POTASSIQUES

L'impressionnante diversité fonctionnelle des canaux potassiques repose en grande partie sur leur très grande diversité génique (*Figure 8*). En effet, chez l'homme, plus de 70 gènes différents codent pour des sous-unités potassiques. Chaque sous-unité possède un ou plusieurs domaines P, qui participent à la formation d'un pore sélectif au potassium, et un nombre variable de segments transmembranaires. On distingue trois grandes familles de canaux potassiques sur la base de leur homologie structurale : la famille des canaux à 6 segments transmembranaires et 1 domaine P, responsable des courants potassiques dépendant du potentiel et des courants sensibles à la concentration intracellulaire de calcium ; la famille des canaux à 2 segments transmembranaires et 1 domaine P, à l'origine



**Figure 9 : Les trois grandes classes structurales de canaux  $K^+$ .**

Les courbes courant-potentiel ( $I/V$ ) sont enregistrées dans des conditions de concentrations potassiques physiologiques (au milieu) et de concentrations potassiques symétriques (en bas).  $E_K$  est le potentiel d'équilibre du potassium,  $E_r$  représente le potentiel de repos de la cellule,  $V_{on}$  le seuil d'activation des canaux potassiques dépendants du potentiel.

des courants à rectification entrante ; et la famille des canaux à 4 segments transmembranaires et 2 domaines P, à l'origine des courants de fond de type GHK. Pour être fonctionnels, ces canaux ont besoin de 4 domaines P, ils sont donc organisés en tétramères quand ils ne possèdent qu'un seul domaine P ou en dimères quand ils en possèdent deux (*Figure 9*).

### I.3.1 Les canaux potassiques à 6 domaines transmembranaires

Ces canaux ont une structure composée de 6 segments transmembranaires ( $S_1$  à  $S_6$ ) et d'un domaine P (*Figure 10*). Deux grandes classes composent cette famille : les canaux dépendant du potentiel et les canaux sensibles à la concentration intracellulaire de calcium. Ces canaux se constituent en tétramères pour être fonctionnels.

#### *I.3.1.1 Les canaux dépendant du potentiel*

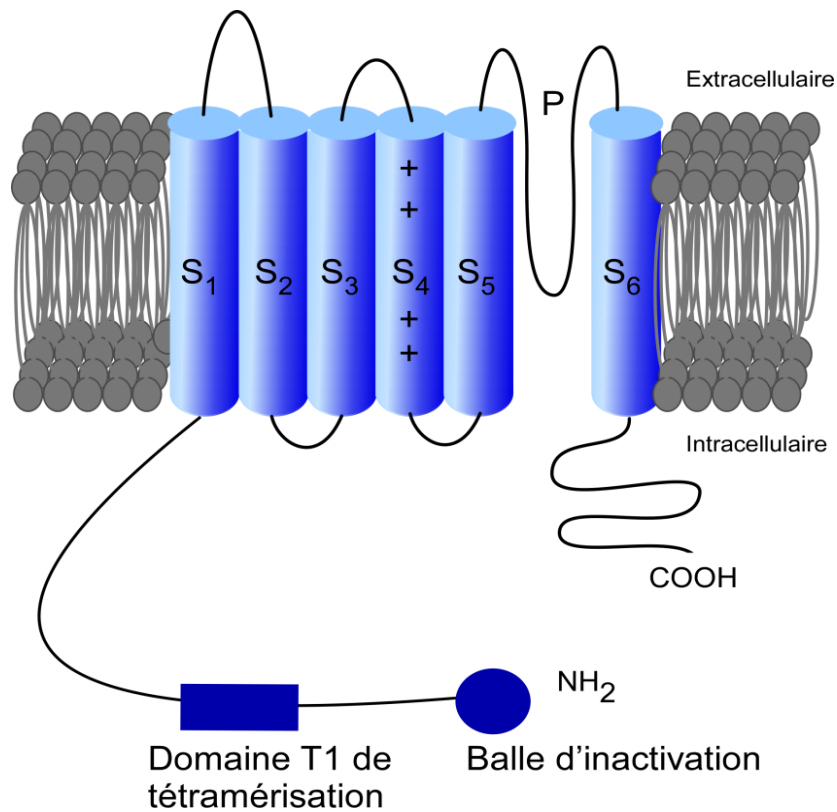
Les membres de la famille des canaux potassiques dépendant du potentiel sont une quarantaine à avoir été clonés aujourd'hui (Wickenden, 2002). Ils ont été regroupés en trois sous-familles sur la base de leurs homologues de structure. On distingue la famille des canaux  $K_v$  ("v" pour voltage), la famille des canaux éther-à-gogo (eag), qui doivent leur nom au phénotype des drosophiles à partir desquelles ils ont été clonés (Kaplan and Trout, 1969), et la sous-famille des canaux KCNQ. Le pourcentage d'homologie entre les membres d'une même sous-famille est proche de 60%, mais n'excède pas 40% quand il s'agit de comparer les sous-familles entre elles (Coetzee *et al.*, 1999). Toutes ces sous-unités présentent la même topologie, c'est-à-dire 6 segments transmembranaires, 1 domaine P, et leurs domaines N- et C- terminaux intracellulaires.

#### a. Mécanismes d'activation et d'inactivation

- Détection du potentiel et mécanisme d'activation :

Le seul segment transmembranaire pouvant prétendre apporter la sensibilité au potentiel de ces canaux est le segment  $S_4$ , qui possède une structure primaire riche en acides aminés chargés positivement (arginine et/ou lysine) (MacKinnon and Miller, 1989; MacKinnon *et al.*, 1990). Différentes expériences ont été menées sur le canal *Shaker*, appartenant à la famille des  $K_v$ , afin de confirmer la fonction de détecteur de potentiel du segment  $S_4$ . Le remplacement des acides aminés électropositifs, un à un ou dans leur totalité par des acides aminés électroneutres, a montré le bien-fondé de la participation du segment





**Figure 10 : Topologie membranaire des sous-unités potassiques à 6 segments transmembranaires et 1 boucle P dépendante du potentiel.**

Quatre boucles P sont nécessaires pour former un pore, ces sous-unités se tétramérisent par l'intermédiaire du domaine T1 situé dans l'extrémité N-terminale. Le segment transmembranaire S<sub>4</sub> est le senseur de voltage apportant la dépendance au potentiel du canal. L'inactivation de type N est réalisée par la balle d'inactivation située dans l'extrémité N-terminale.

S<sub>4</sub> sans pour autant établir une relation entre le nombre de charges et le seuil d'activation. D'après les modèles réalisés, il semble que la dépolarisation entraîne une torsion-translation du segment S<sub>4</sub>, impliquant trois charges positives, et l'apparition de deux résidus arginine chargés à la face externe (Yang *et al.*, 1996). Son changement de conformation serait alors transmis au segment S<sub>6</sub>, favorisant l'ouverture du pore (Bezaniilla, 2002).

Les mécanismes d'activation semblent être les mêmes pour tous les canaux ioniques de structure similaire. Ils sont simplement contrôlés différemment. Pour les canaux potassiques dépendant du potentiel c'est donc la torsion-translation du segment S<sub>4</sub> qui permet l'activation du canal. Le support moléculaire de cette porte d'activation semble être formé par les quatre segments S<sub>6</sub>. Ceux-ci pourraient constituer un obturateur moléculaire. Ces données ont été obtenues grâce à l'image de cristallographie du canal Kcsa (Doyle *et al.*, 1998).

#### - Mécanismes d'inactivation

Suite à leur activation, certains canaux de cette famille entrent dans un état inactivé, qui intervient entre l'état ouvert et l'état fermé. Les mécanismes responsables de cette inactivation ont été identifiés, ils sont de deux types : l'inactivation de type N et l'inactivation de type C.

L'inactivation de type N fait intervenir l'extrémité N-terminale du canal, d'où son nom (Hoshi *et al.*, 1991). Des expériences de délétions ont montré qu'une séquence d'une vingtaine d'acides aminés constitue le segment responsable de l'inactivation. Celui-ci forme une structure compacte, stabilisée par un pont disulfure, qui va obstruer le pore depuis la face cytosolique. Suite à l'activation du canal, cette extrémité vient se fixer sur la boucle cytoplasmique S<sub>4</sub>-S<sub>5</sub>, conduisant à l'obstruction du pore et empêchant ainsi le passage des ions (Isacoff *et al.*, 1991). Certaines sous-unités auxiliaires, de par leur structure compacte, peuvent mimer la balle d'inactivation et donc provoquer l'inactivation rapide des canaux auxquels elle est associée.

L'inactivation de type C apparaît lorsque l'inactivation de type N est abolie, par délétion de la balle d'inactivation par exemple (Hoshi *et al.*, 1990). Elle est cependant partiellement dépendante de l'inactivation de type N puisqu'elle apparaît plus rapidement en présence de la balle d'inactivation (Hoshi *et al.*, 1991). Des expériences de délétions et de mutagenèse dirigée ont montré que ce n'est pas la portion cytoplasmique C-terminale qui est responsable de cette inactivation, comme cela fut pensé au départ (Basso *et al.*, 1998). En fait, ces expériences ont montré que c'est une région située dans la partie extracellulaire du segment S<sub>6</sub> qui est impliquée. Il est maintenant admis que l'inactivation de type C est le résultat d'un changement conformationnel qui a lieu au niveau du segment S<sub>6</sub>, très proche



du pore (Lopez-Barneo *et al.*, 1993), et qui a pour conséquence de fermer le vestibule externe du canal et d'empêcher le passage des ions. Ce phénomène implique les quatre sous-unités formant le canal. La concentration externe en potassium a un rôle prépondérant dans l'efficacité de cette inactivation puisque si elle augmente, la vitesse de l'inactivation est réduite. L'inactivation est également inhibée en présence de TEA externe. Toutes ces observations suggèrent que l'inactivation de type C est favorisée lorsque, sur la face externe du pore, les sites de liaison du potassium sont libres, facilitant alors le changement conformationnel nécessaire à ce processus.

#### b. La famille des Kv

La première sous-unité de ce type clonée est celle du canal potassium *Shaker* de la drosophile. Ce nom lui vient d'un mutant de drosophile qui présente, lorsqu'il est anesthésié à l'éther, des tremblements (Jan *et al.*, 1983). Le criblage des banques de données a permis d'identifier trois autres gènes de la même famille chez la drosophile : *Shab*, *Shaw* et *Shal*. L'expression de ces canaux dans des ovocytes de xénope a conduit à les diviser en deux groupes : les canaux *Shaker* et *Shal* génèrent des courants transitoires de type A, et les canaux *Shaw* et *Shab* génèrent des courants à rectification retardée de type I<sub>D</sub>.

Chez les mammifères, les gènes correspondant à ces canaux ont été identifiés et classés en quatre sous-familles : Kv<sub>1</sub> (*Shaker*), Kv<sub>2</sub> (*Shab*), Kv<sub>3</sub> (*Shaw*) et Kv<sub>4</sub> (*Shal*) (Chandy and Gutman, 1993). D'autres gènes ont été clonés et dans chaque sous-famille (Kv<sub>1</sub> à Kv<sub>9</sub>), une nomenclature permet de nommer les différents gènes codant pour des sous-unités de la même sous-famille (Kv<sub>1.1</sub>, Kv<sub>1.2</sub>, Kv<sub>1.3</sub>...). Ces sous-unités génèrent également des courants de type I<sub>A</sub> et I<sub>D</sub>. Les homologues entre les membres issus d'une même famille sont de l'ordre de 70%, alors qu'elles avoisinent seulement 40% entre les différentes sous-familles. Les sous-unités peuvent s'associer en complexes homotétramériques ou hétérotétramériques, mais dans le second cas, l'association ne peut se produire qu'au sein d'une même sous-famille (Kv<sub>1.2</sub> avec Kv<sub>1.4</sub> par exemple).

#### c. La famille éther-à-gogo (eag)

L'étude d'un autre mutant de drosophile a conduit à la découverte du canal eag (ether-à-gogo), nommé ainsi en raison du phénotype des drosophiles, qui, une fois anesthésiées à l'éther présentent des mouvements saccadés des pattes (Kaplan and Trout, 1969). Ce gène eag possède 6 segments transmembranaires et présente 25% d'identité avec le canal *Shaker*. La particularité de ces canaux est d'être dépendant du potentiel et de posséder dans leur partie C-terminale un site de fixation pour les nucléotides cycliques. Chez

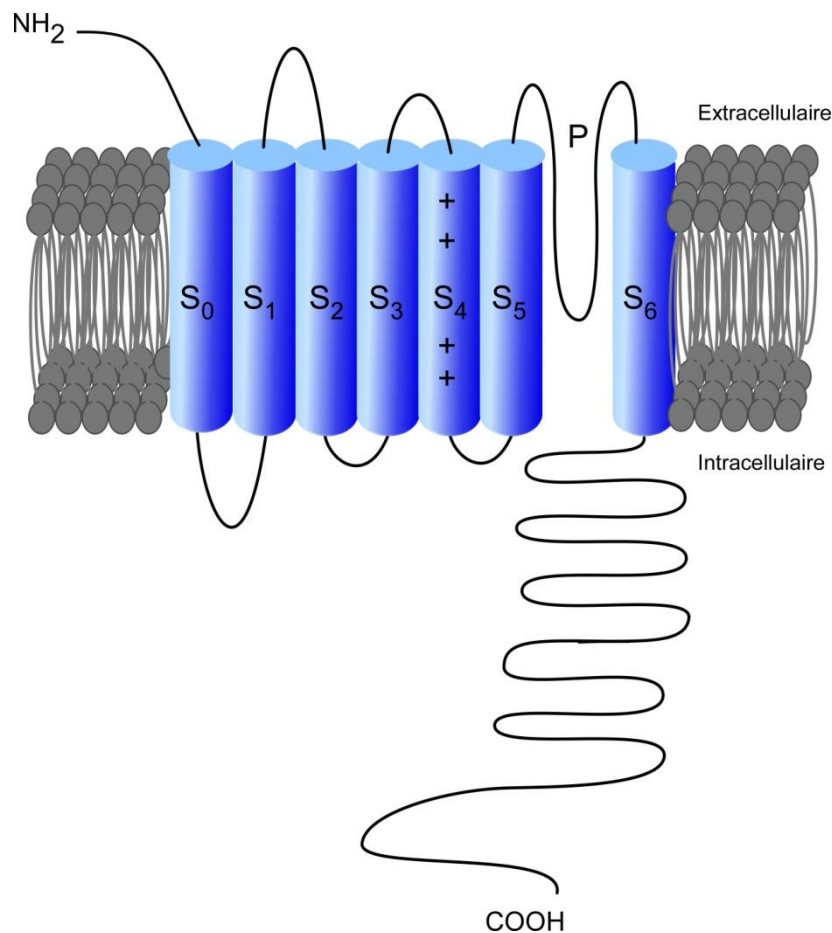


les mammifères, trois sous-familles, qui ont chacune plusieurs membres, ont été identifiées : la sous-famille eag, elk (eag-like-K<sup>+</sup>-channel) (Warmke and Ganetzky, 1994) et erg (eag-related-gene) (Titus *et al.*, 1997). La sous-famille des canaux eag comprend les gènes eag<sub>1</sub> et eag<sub>2</sub> qui codent pour des canaux activés par le potentiel, à activation lente et non inactivant. La sous-famille erg comporte les gènes erg<sub>1</sub> (également appelé HERG chez l'humain), erg<sub>2</sub> qui s'activent très rapidement et présentent les caractéristiques d'un courant I<sub>D</sub> et erg<sub>3</sub>. La sous-famille elk comprend le gène elk<sub>1</sub>, qui génère des courants similaires à ceux de la famille eag mais avec un seuil d'activation plus bas, suggérant un rôle dans le maintien du potentiel de repos, et le gène elk<sub>2</sub> qui code pour un canal qui s'active lentement et présente une inactivation rapide à des potentiels positifs.

#### d. La famille des KCNQ

Le premier membre de cette famille (KCNQ<sub>1</sub> ou KvLQT<sub>1</sub>) a été identifié chez des patients souffrant d'arythmies cardiaques dues au syndrome du long QT familial (Wang *et al.*, 1996). L'expression de ce canal dans les ovocytes de xénope génère un courant dépendant du potentiel de type I<sub>D</sub> à inactivation rapide. Les propriétés de ce courant ne sont pas semblables à celles enregistrées dans les systèmes natifs (I<sub>KS</sub>). Cette différence s'explique par l'absence dans les systèmes hétérologues d'une sous-unité auxiliaire, I<sub>KS</sub> ou KCNE<sub>1</sub>, qui est une petite protéine transmembranaire. L'association de KCNE<sub>1</sub> à KCNQ<sub>1</sub> transforme le courant I<sub>D</sub> à inactivation rapide en un courant à activation et inactivation très lente (Barhanin *et al.*, 1996).

Quatre autres membres de cette famille ont été identifiés (KCNQ<sub>2</sub> à KCNQ<sub>5</sub>). Hormis KCNQ<sub>5</sub>, toutes les autres sous-unités sont impliquées dans des pathologies. Ces canaux sont principalement exprimés dans le système nerveux central, le cœur et l'oreille interne. KCNQ<sub>2</sub> et KCNQ<sub>3</sub> sont associés aux convulsions bénignes infantiles familiales (Charlier *et al.*, 1998). KCNQ<sub>2</sub> est impliqué dans la dépression maniaco-dépressive (Borsotto *et al.*, 2007). KCNQ<sub>4</sub> est quant à lui associé à une forme de surdité (Kubisch *et al.*, 1999). Comme les autres canaux à six domaines transmembranaires, il faut quatre sous-unités  $\alpha$  pour former un canal fonctionnel. Les canaux KCNQ peuvent former soit des homotétramères, soit des hétérotétramères, mais seulement certaines sous-unités en sont capables. Il est maintenant admis que les sous-unités KCNQ sont responsables du courant M dans les neurones, soit sous forme d'homomères, soit sous forme d'hétéromères (Kv<sub>7.2</sub> et Kv<sub>7.3</sub> notamment) (Wang *et al.*, 1998; Selyanko *et al.*, 2002).



**Figure 11 : Topologie membranaire des sous-unités potassiques BK<sub>Ca</sub>, dépendantes du potentiel et sensibles aux concentrations intracellulaires de calcium.**

Le segment transmembranaire S<sub>4</sub> est le senseur de voltage apportant la dépendance au potentiel du canal. Ces sous-unités possèdent un segment transmembranaire supplémentaire (S<sub>0</sub>), comparé aux sous-unités à 6 segments transmembranaires. L'extrémité N-terminale est donc extracellulaire. L'extrémité C-terminale est très longue (800 acides aminés) et apporte la sensibilité au calcium au canal.

### 1.3.1.2 Les canaux sensibles à la concentration intracellulaire de calcium

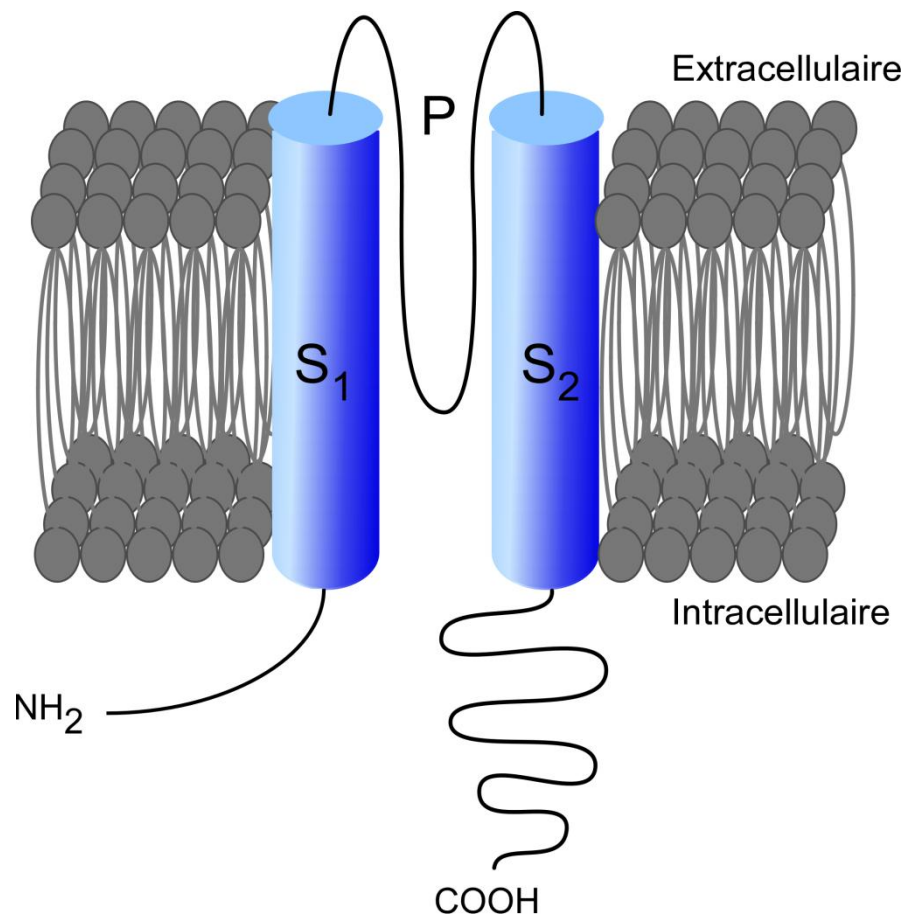
Comme nous l'avons vu précédemment, les canaux potassiques sensibles à la concentration intracellulaire de calcium se divisent en 3 sous-familles, en fonction de leur conductance unitaire : les canaux  $B_K$  ( $Slo_1$ ,  $Slo_3$ , Slack et Slack-related 1), les canaux  $I_K$  ( $I_{K4}$ ) (Ishii *et al.*, 1997) et les canaux  $S_K$  ( $S_{K1}$ ,  $S_{K2}$  et  $S_{K3}$ ). Le premier gène identifié l'a été grâce à l'étude des mutants de drosophile (Komatsu *et al.*, 1990) (Atkinson *et al.*, 1991). Les canaux  $B_K$  ont une topologie particulière, même si le cœur de leur sous-unité  $\alpha$  est assez semblable à celui des canaux à 6 segments transmembranaires et 1 domaine P. Ils ont un segment transmembranaire supplémentaire à l'extrémité N-terminale qui se retrouve alors en position extracellulaire, contrairement à celles des autres canaux à 6 segments transmembranaires (*Figure 11*). Ils possèdent également une extrémité C-terminale de plus de 800 résidus qui se replie en 4 hélices  $\alpha$  (appelées  $S_7$ - $S_{10}$ ) (Vergara *et al.*, 1998). La sensibilité au calcium de ces canaux semble être portée par une région riche en résidus acides (appelée "calcium bowl") située au niveau des segments  $S_9$  et  $S_{10}$  de leur extrémité C-terminale. Leur sensibilité au potentiel et au calcium est exacerbée par la fixation d'une sous-unité  $\beta$ . Quatre sous-unités  $\alpha$  s'associent à 4 sous-unités  $\beta$  pour former un canal.

Les canaux  $I_K$  et  $S_K$  ne dépendent pas du potentiel et ne s'ouvrent qu'à la suite d'une augmentation intracellulaire de calcium. Ces sous-unités possèdent une structure classique comprenant 6 segments transmembranaires et une boucle P. Leur sensibilité au calcium leur est conférée par la fixation de la calmoduline (Xia *et al.*, 1998).

## 1.3.2 Les canaux potassiques à 2 domaines transmembranaires

L'existence de courants dits anormaux, parce qu'ils permettent le passage préférentiel du potassium dans le sens entrant, a permis la découverte de toute une famille de canaux potassiques. Les premiers ont été clonés, par expression fonctionnelle dans des ovocytes de xénope de reins de rats, pour  $KCNJ_1$  ( $ROMK_1$  ou  $Kir_{1.1}$ ) (Ho *et al.*, 1993) ou d'une lignée de macrophages pour  $KCNJ_2$  ( $IRK_1$  ou  $Kir_{2.1}$ ) (Kubo *et al.*, 1993). Par la suite, différents clonages par homologies de séquences ont permis d'identifier de nombreux autres gènes (Morishige *et al.*, 1994) (Lesage *et al.*, 1994) (Ashford *et al.*, 1994). Aujourd'hui on dénombre 16 canaux appartenant à cette famille, qui ont été classés en 7 sous-familles. Tous présentent 2 segments transmembranaires et une boucle P. Quatre sous-unités  $\alpha$  doivent donc s'associer pour former un canal fonctionnel qui peut alors exister sous la forme d'homotétramères ou d'hétérotétramères (Duprat *et al.*, 1995) (Lesage *et al.*, 1995). Ils ne possèdent pas en revanche l'équivalent du senseur de potentiel ("voltage sensor") situé





**Figure 12 : Topologie membranaire des sous-unités potassiques à 2 segments transmembranaires et 1 boucle P.**

dans le 4<sup>ème</sup> segment transmembranaire, ce qui explique que ces canaux ne présentent pas de dépendance intrinsèque au potentiel de membrane (*Figure 12*). Comme nous l'avons vu précédemment, la caractéristique des courants générés par cette famille de canaux est leur rectification entrante. Ils s'organisent en quatre grandes familles fonctionnelles définies selon leur régulation et les protéines qui leur sont associées (pour revue (Hibino *et al.*)).

#### 1.3.2.1 Les canaux à rectification entrante classique

Cette famille est constituée des canaux Kir<sub>2.1</sub>, Kir<sub>2.2</sub>, Kir<sub>2.3</sub> et Kir<sub>2.4</sub>. Ils sont constitutivement actifs et présentent une forte rectification entrante due au magnésium et aux polyamines. Ils ne sont régulés ni par le métabolisme ni par les neurotransmetteurs agissant *via* les protéines G. Seul le canal Kir<sub>2.3</sub> présente une sensibilité à l'acidification cellulaire et est bloqué par des concentrations intracellulaires physiologiques d'ATP. Ils sont impliqués dans le contrôle du potentiel de repos des cellules qui les expriment, notamment les neurones et les cellules cardiaques.

#### 1.3.2.2 Les canaux à rectification entrante inhibés par l'ATP (K<sub>ATP</sub>)

Ces canaux ont été décrits pour la première fois dans les myocytes cardiaques (Noma, 1983). Ils ont ensuite été caractérisés dans de nombreux tissus, notamment le muscle squelettique (Spruce *et al.*, 1985), le cerveau (Ashford *et al.*, 1988), les cellules du tubule rénal (Pell *et al.*, 1998) et les cellules  $\beta$ -pancréatiques (Cook *et al.*, 1988). Comme les canaux à rectification entrante classique, ces canaux sont ouverts à tous les potentiels de membrane. En revanche, leur activité est directement contrôlée par l'état énergétique de la cellule et plus particulièrement le rapport des concentrations intracellulaires [ATP]/[ADP]. Lorsque ce rapport diminue, par exemple à la suite d'une hypoglycémie, ces canaux s'activent et entraînent une diminution de l'excitabilité cellulaire. A l'inverse, lorsque ce rapport augmente les canaux se ferment créant ainsi une dépolarisation et une augmentation de l'excitabilité de la cellule (Lazdunski *et al.*, 1994) (Bryan and Aguilar-Bryan, 1997) (Ashcroft and Gribble, 1998). Cette famille comprend deux membres : Kir<sub>6.1</sub> et Kir<sub>6.2</sub>, qui, grâce à leurs propriétés sont impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques, notamment la sécrétion d'insuline dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques (Ashcroft *et al.*, 1988) (Cook *et al.*, 1988), la libération de neurotransmetteurs (Amoroso *et al.*, 1990) ou encore la réabsorption du potassium par le tubule rénal (Misler *et al.*, 1992). Ces canaux peuvent également s'associer à un récepteur aux sulfonylurées (SUR) qui fixe l'ATP. L'association Kir<sub>6.x</sub>/SUR forme les bases moléculaires des canaux K<sub>ATP</sub> (Aguilar-Bryan *et al.*, 1998) (Seino, 1999).

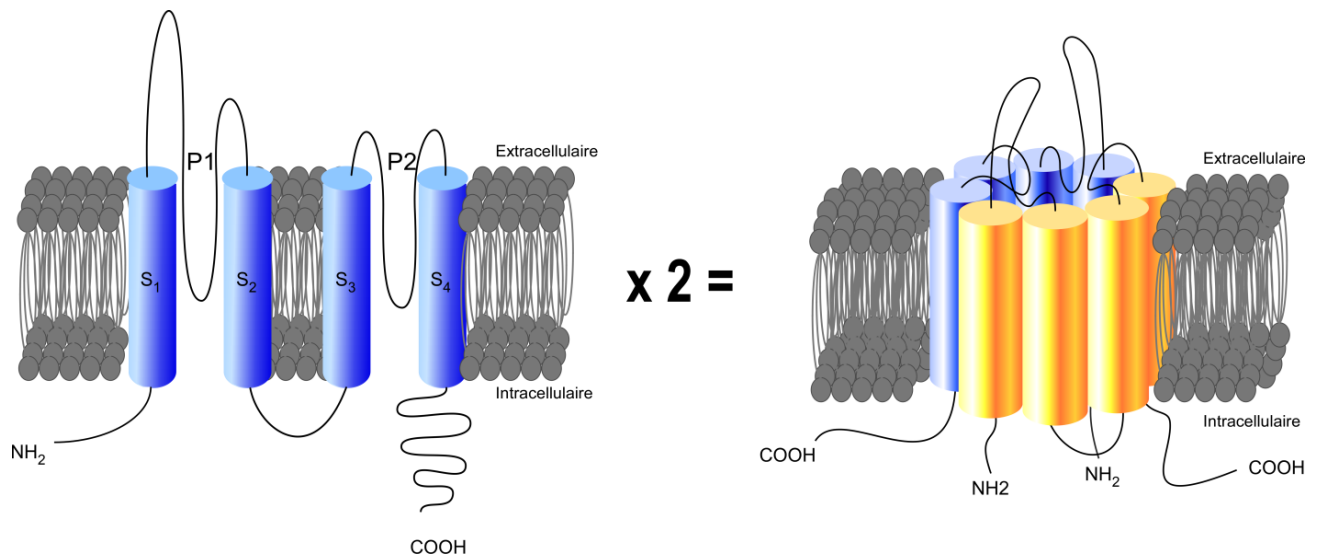


### 1.3.2.3 Les canaux à rectification entrante activés par l'ATP

Les canaux Kir<sub>1.1</sub> (ROMK<sub>1-6</sub>) et Kir<sub>4.1</sub> (ou Kir<sub>1.2</sub>) possèdent un site de liaison à l'ATP au niveau de leur extrémité C-terminale et génèrent des courants à rectification entrante dans des systèmes d'expression hétérologues. Ils sont activés par le MgATP et inhibés par une acidification du milieu intracellulaire (Ho *et al.*, 1993) (Shuck *et al.*, 1997) (Takumi *et al.*, 1995). Ces sous-unités sont principalement exprimées dans les cellules épithéliales du tubule collecteur du rein où elles jouent un rôle prépondérant dans l'homéostasie du potassium. Un autre membre de cette famille, le canal Kir<sub>4.2</sub> (ou Kir<sub>1.3</sub>) est également inhibé par une acidification du milieu intracellulaire mais il ne possède pas de séquence consensus de fixation du MgATP (Gosset *et al.*, 1997). Le canal Kir<sub>5.1</sub> appartient aussi à cette famille, mais il n'est pas fonctionnel lorsqu'il est exprimé seul. En revanche, il peut s'associer aux sous-unités Kir<sub>4.1</sub> et Kir<sub>4.2</sub> et modifier leurs propriétés, notamment leur sensibilité à l'acidification (Bond *et al.*, 1994) (Pessia *et al.*, 1996) (Tanemoto *et al.*, 2000). Le canal Kir<sub>7.1</sub> a également été classé dans cette sous-famille, mais il possède moins de 40% d'homologie avec la sous-unité Kir<sub>4.2</sub>. Ses propriétés biophysiques sont aussi très différentes de celles des autres membres. Sa conductance unitaire est très faible et sa rectification entrante est indépendante du magnésium (Doring *et al.*, 1998) (Krapivinsky *et al.*, 1998).

### 1.3.2.4 Les canaux à rectification entrante activés par les protéines G

Cette famille comprend quatre membres : Kir<sub>3.1</sub>, Kir<sub>3.2</sub>, Kir<sub>3.3</sub> et Kir<sub>3.4</sub> (ou encore GIRK<sub>1</sub> à <sub>4</sub>) (Inanobe *et al.*, 2007). Ces canaux sont exprimés dans de nombreuses structures : cœur, cerveau, pancréas... Tous, à l'exception de Kir<sub>3.1</sub>, peuvent former des homotétramères. Ils peuvent cependant tous s'assembler en hétérotétramères modifiant ainsi leurs propriétés biophysiques. La composition de ces hétérotétramères varie selon les cellules et les tissus, ce qui leur permet d'avoir de nombreux rôles physiologiques différents. Les caractéristiques électrophysiologiques de ces courants sont quasiment identiques (Jelacic *et al.*, 1999). Ils produisent des courants à rectification entrante qui sont activés par les protéines G, soit par le GTP intracellulaire libéré en présence de l'agoniste du récepteur couplé à la protéine G, soit par du GTPγS (un analogue perméant du GTP) en absence de l'agoniste. Dans le cœur, les hétérotétramères Kir<sub>3.1</sub>/Kir<sub>3.4</sub> sont par exemple responsables de la décélération du rythme cardiaque en réponse à la libération d'acétylcholine par le nerf vague (Krapivinsky *et al.*, 1995). Dans le cerveau, où tous ces canaux sont exprimés, ils sont impliqués dans de nombreux processus différents, comme les potentiels postsynaptiques inhibiteurs ou encore la modulation présynaptique de la libération de neurotransmetteur et ceci grâce à la distribution subcellulaire précise des différentes sous-unités : Kir<sub>3.1</sub> (Morishige *et al.*, 1996) et Kir<sub>3.2</sub> (Inanobe *et al.*, 1999) sont présents dans les régions pré- et postsynaptiques, alors



**Figure 13 : Topologie membranaire et dimérisation des sous-unités potassiques à 4 segments transmembranaires et 2 boucles P.**

Quatre boucles P sont nécessaires pour former un pore. Ces sous-unités se dimérisent pour former un canal fonctionnel.

que Kir<sub>3.4</sub> a seulement été détecté dans l'extrémité du cône de croissance (Wickman *et al.*, 2000) (pour revue (Hibino *et al.*, 2010)).

### I.3.3 Les canaux potassiques à 4 segments transmembranaires et 2 domaines P

La famille des canaux potassiques à deux domaines P est la famille des canaux potassiques la plus récemment découverte (Lesage and Lazdunski, 2000). Ils sont responsables des courants de fuite décrits précédemment et jouent un rôle majeur dans le contrôle de l'excitabilité cellulaire grâce à leur rôle dans l'établissement et le maintien du potentiel de repos. Le premier canal responsable de ce type de courant a été isolé chez la levure *Saccharomyces Cerevisiae* par différents laboratoires qui lui attribuèrent plusieurs noms : TOK<sub>1</sub> (Tandem P domain Outward rectifier K<sup>+</sup> Channel) (Ketchum *et al.*, 1995), YKC<sub>1</sub> (Yeast K<sup>+</sup> Channel) (Zhou *et al.*, 1995), YORK (Yeast Outward Rectifier K<sup>+</sup> channel) (Lesage *et al.*, 1996) ou encore DUK<sub>1</sub> (Duplicate pore K<sup>+</sup> Channel) (Reid and Flonta, 2001). Cette sous-unité est formée de 8 segments transmembranaires et 2 boucles P.

La famille des canaux à deux boucles P, ou K<sub>2P</sub> semble avoir une importance capitale puisqu'il a été montré par la suite qu'elle est conservée dans de nombreuses espèces très éloignées telles que le nématode (Kunkel *et al.*, 2000), la levure (Lesage *et al.*, 1996), la drosophile (Goldstein *et al.*, 1996), ainsi que chez la plante *Arabidopsis Thaliana* (Czempinski *et al.*, 1997).

Je vais décrire ici la structure et les propriétés des différentes sous-familles de canaux composant cette famille. Toutefois, je m'intéresserai plus longuement aux canaux TWIK1, TREK1 et TREK2 sur lesquels ont porté mes travaux de thèse.

#### *I.3.3.1 Les canaux potassiques à 2 domaines P de mammifères*

##### - Structure des canaux potassiques à 2 domaines P

Après la caractérisation du canal TOK1, l'interrogation des bases de données a permis d'identifier 15 gènes codants pour des canaux potassiques à 2 domaines P. Le premier canal cloné, TWIK1 (Tandem of P-domain in Weak Inward Rectifier K<sup>+</sup> channel) ou KCNK1, possède la même structure que le canal de drosophile ORK1 (Outward Rectifier K<sup>+</sup> channel). Ces canaux possèdent 4 segments transmembranaires, 2 boucles P et ses régions N- et C-terminales sont intracellulaires (Lesage *et al.*, 1996) (*Figure 13*). Si l'extrémité N-terminale est relativement courte, l'extrémité C-terminale peut contenir plus d'une centaine de

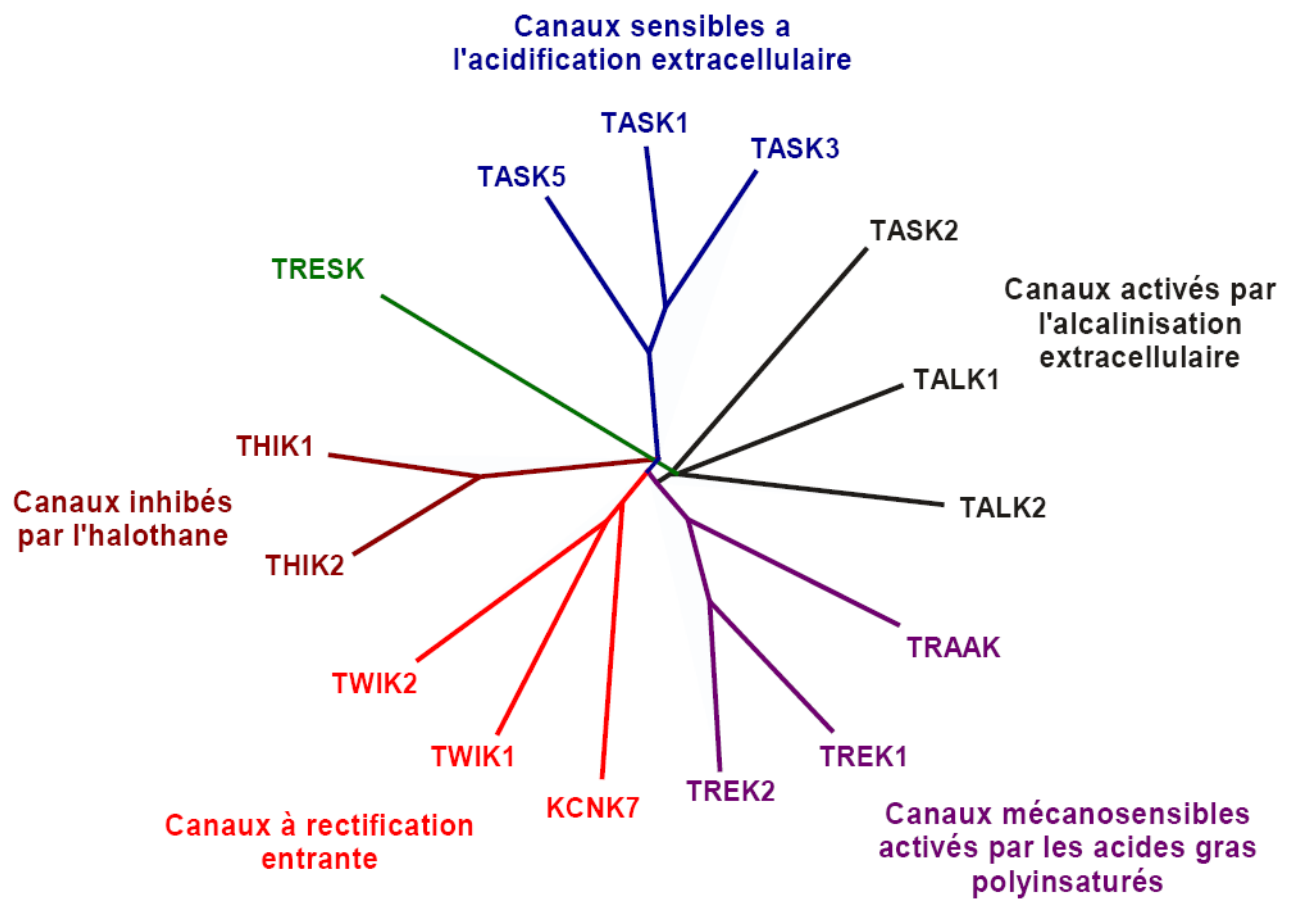


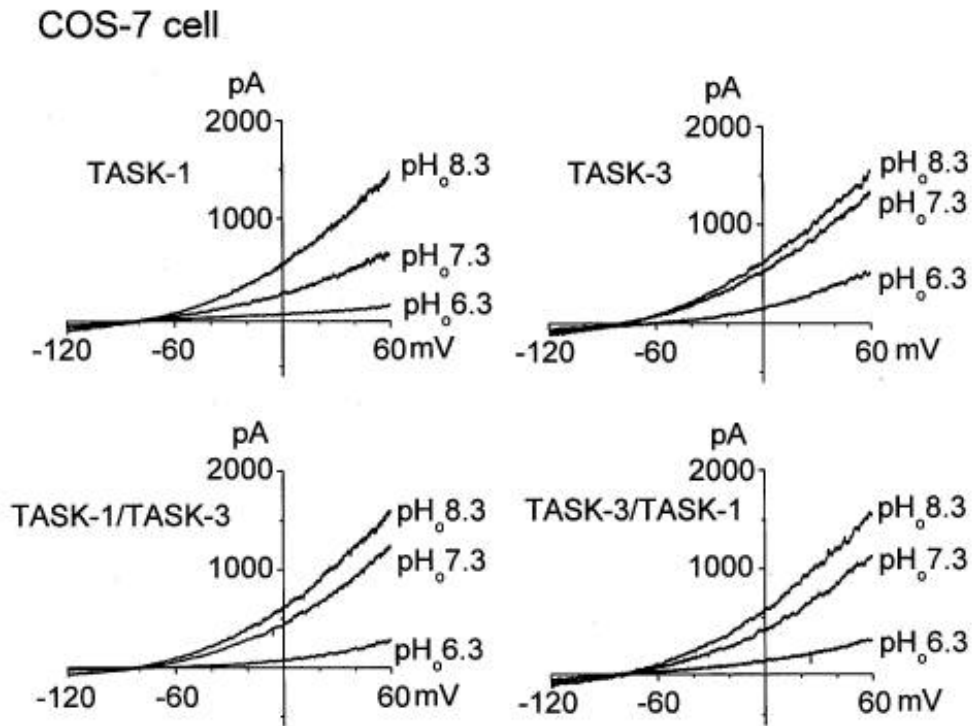
Figure 14 : Arbre phylogénétique des différentes sous-unités à 4 segments transmembranaires et 2 boucles P.

résidus. Une caractéristique des canaux de cette famille est l'existence entre les domaines  $M_1$  et  $P_1$  d'une longue boucle extracellulaire de 60 à 70 acides aminés ayant une structure en hélice  $\alpha$  et un site de N-glycosylation. La signature des pores de ces sous-unités n'est pas toujours GYG comme cela est le cas pour la grande majorité des canaux potassiques. Certains présentent de petites différences, notamment TWIK1 et TWIK2 chez qui une leucine est située à la place de la glycine (GLG à la place de GYG) (Lesage *et al.*, 1996) dans le second pore du canal, ou encore KCNK7 dans lequel un glutamate remplace une glycine (GLE à la place de GYG) (Salinas *et al.*, 1999). De plus, les canaux de cette famille ne possèdent pas de structure équivalente au "voltage-sensor" des sous-unités à 6 segments transmembranaires. Bien qu'elles possèdent toutes la même topologie, le pourcentage d'homologie entre les différentes sous-unités de cette famille de canaux est relativement faible (environ 40%), les plus grandes divergences se trouvant au niveau de l'extrémité C-terminale. Toutefois c'est en fonction de ces homologies que les 15 canaux de mammifères ont été regroupés en 5 sous-familles (*Figure 14*).

- Dimérisation des sous-unités à 4 segments transmembranaires et 2 boucles P

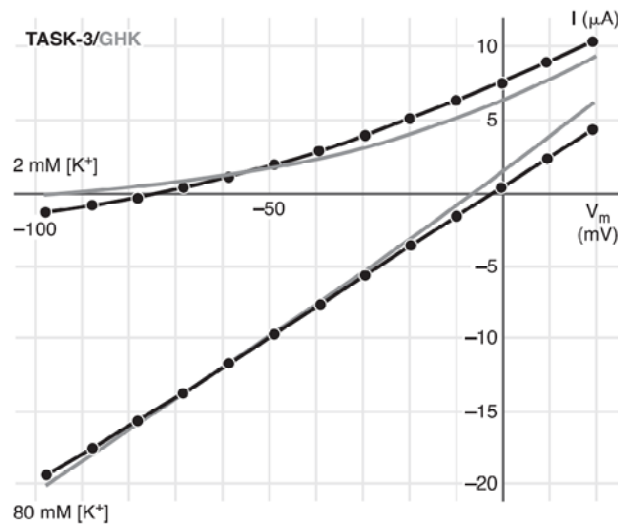
Compte tenu de la tétramérisation des sous-unités à 6 segments transmembranaires ne possédant qu'un seul domaine P pour former des canaux potassiques fonctionnels, il a très vite été envisagé que 2 sous-unités à 2 domaines P suffiraient pour former un canal fonctionnel (*Figure 13*). Cette hypothèse a été confirmée quelques mois après le clonage du canal TWIK1 par Lesage, *et al.*, par une approche biochimique (Lesage *et al.*, 1996). Lors d'expériences de Western Blot réalisées dans des conditions non réductrices, une bande correspondant au double de la taille théoriquement attendue pour la sous-unité TWIK1 est marquée. En conditions réductrices, cette bande disparaît alors qu'apparaît une bande correspondant à la taille théorique de TWIK1. Des expériences de mutagenèse dirigée ont ensuite permis d'identifier le motif responsable de cette dimérisation. Dans le cas de TWIK1, il s'agit d'une région d'une trentaine de résidus situés dans la boucle  $M_1P_1$ . Cette région s'organise en hélice  $\alpha$ , et une cystéine présente dans cette région permet d'établir un pont disulfure entre 2 sous-unités. Cependant cette cystéine en position 69 n'est pas conservée dans tous les canaux de cette famille. Tous ont pour autant besoin de se dimériser pour former un canal fonctionnel. Dans les familles des canaux à 6 et 2 segments transmembranaires, la multimérisation peut avoir lieu entre sous-unités identiques, mais également entre des sous-unités différentes, ce qui a pour conséquence d'augmenter la diversité des courants potassiques. Plusieurs études suggèrent que cette propriété serait également partagée par certains membres de la famille des canaux à 2 domaines P, même si la plupart s'associe en homodimères. Grâce à la pharmacologie particulière des sous-unités TASK1 et TASK3, il a été montré que les canaux TASK pouvaient exister à la fois dans des





**Figure 15 : Sensibilité des canaux TASK aux variations de pH extracellulaire.**

Courbes courant/potentiel et sensibilité aux variations du pH extracellulaire des canaux TASK1, TASK3 et des hétéromultimères TASK1-TASK3 dans des cellules COS (modifiée d'après Kang et al., 2004).



**Figure 16 : Comparaison des courants TASK3 avec les courants théoriques de l'équation GHK.**

Les courants TASK3 ont été enregistrés dans des ovocytes de xénope, grâce à une dépolarisation de -100mV à +20mV par incréments de 10mV en condition de potassium physiologique ou symétrique (d'après Enyedi et al., 2010).

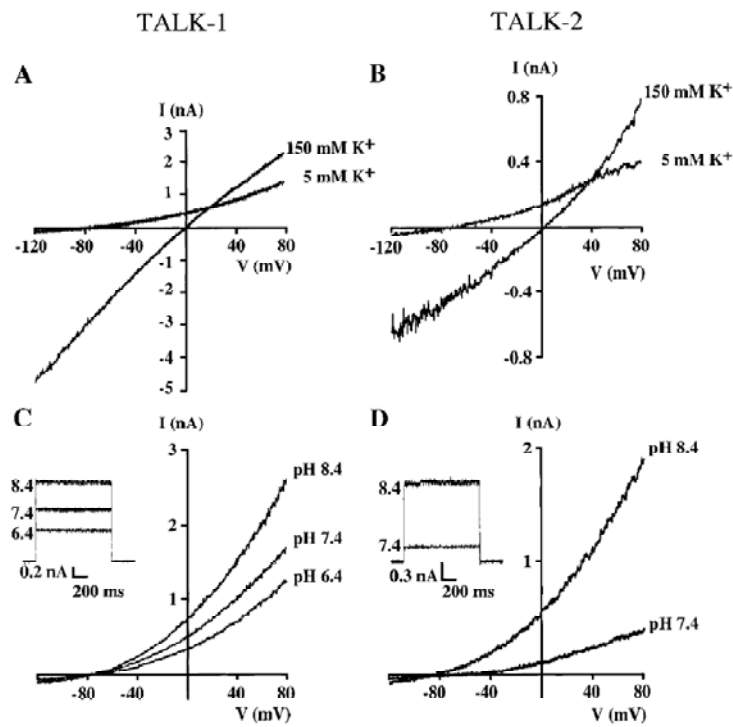
systèmes hétérologues et dans des systèmes natifs sous forme d'hétérodimères (Czirjak and Enyedi, 2002; Lauritzen *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2004).

### 1.3.3.2 La sous-famille des canaux TASK1, TASK3 et TASK5

Cette sous-famille comprend trois sous-unités, dont un membre non fonctionnel, TASK5. Cette sous-unité ne semble pas former des hétéromultimères avec les autres canaux de la sous-famille (Ashmole *et al.*, 2001; Kim and Gnatenco, 2001). Les deux autres sous-unités : TASK1 (Duprat *et al.*, 1997) et TASK3 (Kim *et al.*, 2000) possèdent 54% d'identité et l'hétéromultimérisation a été démontrée. Ces canaux présentent les propriétés des canaux potassiques de fond de type GHK. Les canaux TASK sont caractérisés par des courants à rectification sortante en conditions physiologiques, qui deviennent linéaires en condition de potassium symétrique (*Figure 15*) (Duprat *et al.*, 1997). La conductance unitaire du canal TASK3 est supérieure à celle de TASK1. Comme les autres membres de la famille, ces courants sont insensibles au TEA et à la 4-AP. La quinine, la quinidine, le rouge de ruthénium (10  $\mu$ M) et le zinc (100  $\mu$ M) inhibent TASK3 mais ont peu d'effets sur TASK1 ou sur les hétéromères TASK1/3, ce qui fait de ces molécules de bons outils pour identifier les différents courants TASK dans un système natif (Czirjak and Enyedi, 2002; Czirjak and Enyedi, 2003). L'anandamide, un endocannabinoïde endogène, permet également de distinguer ces canaux puisqu'elle inhibe spécifiquement TASK1 (Maingret *et al.*, 2001).

TASK1 et TASK3 sont très sensibles aux variations de pH extracellulaire, ils sont inhibés par une acidification et activés par une alcalinisation extracellulaire pour des valeurs de pH physiologiques (TASK pour TWIK-related Acid Sensing  $K^+$  channel). TASK3 est cependant un peu moins sensible que TASK1 et les hétéromères ont une sensibilité intermédiaire à celles de TASK1 et TASK3 (Kang *et al.*, 2004) (*Figure 16*). Ces canaux sont également activés par des concentrations cliniques d'anesthésiques volatils comme l'halothane et l'isoflurane (Patel *et al.*, 1999). TASK1 est exprimé dans le cerveau, la moëlle épinière, le pancréas et le placenta. TASK3, quant à lui, est détecté dans le système nerveux central, et plus particulièrement dans le cervelet (Talley *et al.*, 2001). Certains neurotransmetteurs (acétylcholine, sérotonine, norépinéphrine) inhibent les canaux TASK via leurs récepteurs couplés aux protéines G (pour revue (Bayliss *et al.*, 2003)).

Grâce à leurs propriétés, et notamment leur inhibition par l'hypoxie, ils sont sensibles aux variations de la pression d'oxygène. L'inhibition des canaux TASK dans les neurones respiratoires du tronc cérébral et les cellules de la crosse aortique par l'acide et/ou par l'hypoxie joue un rôle central dans l'initiation du réflexe de ventilation (Duprat *et al.*, 2007).



**Figure 17 : Expression des canaux TALK1 et TALK2 dans des cellules COS.**

A. et B. Courbes courants/potentiel de TALK1 (A) et TALK2 (B) obtenues en conditions physiologiques (5mM  $K^+$ ) ou en conditions de potassium symétrique (150mM  $K^+$ ). Les courants sont obtenus à partir de rampes de potentiel de -130mV à +80mV. La rectification sortante observée en conditions physiologiques est maintenue en potassium symétrique seulement pour la sous-unité TALK2.

C. et D. Courbes courants/potentiel de TALK1 (C) et TALK2 (D) enregistrées pour différentes valeurs de pH de la solution extracellulaire (d'après Girard *et al.*, 2002).

Les canaux TASK sont également impliqués dans la mort par apoptose des neurones granulaires de cervelet en culture (Lauritzen *et al.*, 2003).

### 1.3.3.3 La sous-famille des canaux TASK2, TALK1 et TALK2

Ces canaux sont membres de la sous-famille TALK (TWIK-related Alkaline pH activated  $K^+$  channel). Leur nom vient du fait qu'ils sont activés par une alcalinisation extracellulaire.

Le premier membre identifié, TASK2, fut cloné à partir d'ADNc de rein (Reyes *et al.*, 1998). Cette sous-unité présente seulement 30% d'identité avec les membres de la famille TASK, dont elle a pourtant hérité le nom, en raison notamment de sa sensibilité au pH extracellulaire. Les courants TASK2 ne s'inactivent pas, mais ils ont la particularité d'avoir une cinétique d'activation mesurable. Ils sont inhibés par la quinine (22  $\mu$ M) et par les anesthésiques locaux comme la lidocaïne (Kindler *et al.*, 2003). Ils sont par contre activés par les anesthésiques généraux tels que l'halothane ou le chloroforme (Gray *et al.*, 2000). Ils sont également activés par une augmentation du volume cellulaire, et semblent impliqués dans la régulation du volume cellulaire (RVD pour regulatory volume decrease) des cellules de Ehrlich (Niemeyer *et al.*, 2001). Cette sous-unité est exprimée dans le cerveau (Gabriel *et al.*, 1998), le pancréas, le foie, ou encore le rein où il joue un rôle dans le transport du bicarbonate par le tubule proximal (Warth *et al.*, 2004).

Quelques années plus tard, deux autres canaux ont été clonés présentant des caractéristiques semblables à TASK2 (Girard *et al.*, 2001). Ces deux sous-unités génèrent des courants qui sont activés de façon instantanée et qui ne s'inactivent pas. Ils présentent une rectification sortante en conditions physiologiques, qui dans le cas de TALK2 persiste en potassium symétrique (*Figure 17*). Comme TASK2, ces deux sous-unités sont fortement activées par une alcalinisation du milieu extracellulaire. Elles sont également activées par le monoxyde d'azote et les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS : reactive oxygen species) (Duprat *et al.*, 2005). Toutes deux sont inhibées partiellement par le baryum (1 mM) et la quinidine (1 mM). Elles ne sont pas sensibles à l'acide arachidonique mais TALK1 et TALK2 sont inhibés par l'halothane et le chloroforme (800  $\mu$ M). Par contre ils se distinguent par leur sensibilité à l'isoflurane (800  $\mu$ M) qui active spécifiquement TALK2 mais n'a aucun effet sur TALK1 (Girard *et al.*, 2001). Il est donc possible de différencier ces deux canaux, grâce également à leurs conductances unitaires qui sont différentes (Kang and Kim, 2004).

La sous-unité TALK1 est exclusivement détectée dans le pancréas, alors que TALK2 est retrouvée un peu plus largement, dans le pancréas mais également dans le foie, le cœur et les poumons (Decher *et al.*, 2001). Il a été montré que l'expression des canaux TALK1 et



TALK2 est restreinte à la partie exocrine du pancréas, alors que TASK2 est aussi présent dans les îlots de Langerhans (Duprat *et al.*, 2005). Cette distribution particulière pourrait suggérer un rôle dans le contrôle de la sécrétion des cellules exocrines du pancréas.

#### *1.3.3.3 La sous-famille des canaux THIK1 et THIK2*

Les canaux THIK1 et THIK2 (Tandem pore domain Halothane-Inhibited K<sup>+</sup> channel), clonés chez le rat, forment une sous-famille de canaux K<sub>2P</sub> relativement éloignés des autres puisque le pourcentage d'identité n'excède pas 30% (Rajan *et al.*, 2001). Lors de son expression dans des ovocytes de xénope, THIK1 génère un courant qui s'active instantanément et qui ne s'inactive pas. En condition physiologique, ce courant présente une rectification sortante qui évolue en une rectification entrante en condition de potassium symétrique. THIK1 est partiellement bloqué par le baryum et légèrement inhibé par une acidification extracellulaire. L'acidification du milieu intracellulaire n'a aucune conséquence sur THIK1. Par contre, il est sensible à l'halothane, d'où son nom. Il est activé par l'acide arachidonique (Rajan *et al.*, 2001). Cette sous-unité est très exprimée dans le cerveau, les reins, le foie, les poumons et le cœur (Theilig *et al.*, 2008). THIK1 pourrait être à l'origine de la conductance potassique de fond des neurones de Purkinje (Bushell *et al.*, 2002).

A l'inverse de THIK1, la sous-unité THIK2 ne génère aucun courant lorsqu'elle est exprimée dans les ovocytes de xénope. Pourtant des expériences de microscopie ont montré que la protéine THIK2 était correctement traduite et exprimée à la membrane des cellules. La sous-unité THIK2 n'est pas non plus capable de réguler THIK1 lorsqu'elles sont exprimées ensemble. Elle ne semble donc pas être une sous-unité régulatrice (Rajan *et al.*, 2001). Ce canal, pourtant très largement exprimé dans de nombreux organes, n'a donc jamais été enregistré et reste encore très peu connu.

#### *1.3.3.4 La sous-famille du canal TRESK*

Le canal TRESK (TWIK-Related Spinal cord K<sup>+</sup> Channel) doit son nom à sa présence dans la moëlle épinière (Sano *et al.*, 2003). Depuis, ce canal a été détecté dans de nombreuses autres structures, notamment dans différentes populations de neurones du système nerveux central (cortex et cervelet), mais aussi dans d'autres organes périphériques (foie, pancréas, thymus et reins) (Keshavaprasad *et al.*, 2005). Le canal TRESK a une structure très différente des autres canaux de la famille, avec lesquels il ne partage que très peu d'homologie (19%). En effet, ses deux extrémités N- et C-terminales sont très courtes, et il possède une longue boucle intracellulaire entre les segments 2 et 3. Lorsqu'il est exprimé



dans des systèmes hétérologues, ces canaux produisent des courants à rectification sortante de faible conductance dans des conditions physiologiques qui sont instantanés et qui ne s'inactivent pas. Ils sont insensibles aux bloqueurs classiques des canaux potassiques tels que le TEA ou la 4-AP. Par contre ils sont sensibles à la plupart des bloqueurs des  $K_{2p}$ . Ils sont inhibés par le baryum, la quinine, la quinidine, le zinc et le mercure (Czirjak *et al.*, 2004) mais également par les acides gras poly-insaturés et par une acidification intracellulaire (Sano *et al.*, 2003). Ils sont activés par les anesthésiques volatils et par une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium (Liu *et al.*, 2004). Ces canaux sont donc impliqués, au moins en partie, dans les processus d'anesthésie. Il est également possible que TRESK, qui est fortement exprimé dans les neurones de DRG, et qui semble y être responsable de la majeure partie des courants potassiques de fuite, soit impliqué dans la nociception (Keshavaprasad *et al.*, 2005; Kang and Kim, 2006). En effet, les douleurs neuropathiques notamment, sont liées à une excitabilité exacerbée des neurones DRG, dont TRESK pourrait, par son inhibition, être responsable (Ji and Woolf, 2001; Vadivelu and Sinatra, 2005; Huang *et al.*, 2008).

Une seconde sous-unité, proche de TRESK et nommée TRESK2 a été clonée en 2004 chez le rat et la souris (Kang *et al.*, 2004). Elle présente les mêmes propriétés électrophysiologiques que TRESK. Aujourd'hui, il n'est pas encore clair que TRESK2 soit une nouvelle sous-unité appartenant à la famille des  $K_{2p}$ . Elle pourrait être l'orthologue murin de TRESK.

### *1.3.3.5 La sous famille des canaux TWIK1, TWIK2 et KCNK7*

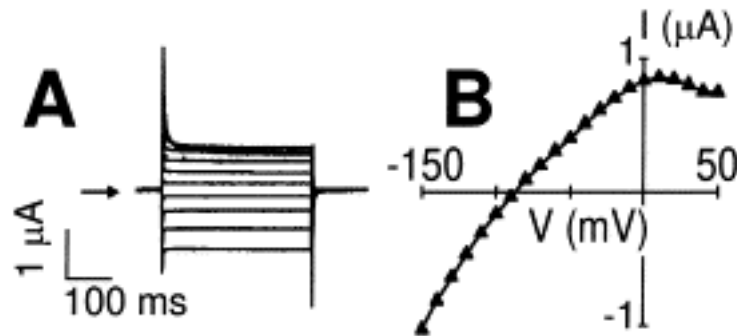
#### a. Le canal TWIK1

##### Propriété des canaux TWIK1

La sous-unité TWIK1 (Tandem of P domains in a Weak Inwardly rectifying  $K^+$  channel) est une protéine de 336 acides aminés (Lesage *et al.*, 1996) qui, comme nous l'avons vu, se dimérise par un pont disulfure pour former un canal fonctionnel (Lesage *et al.*, 1996). Cette protéine possède un site de N-glycosylation dans sa boucle  $M_1P_1$  et trois sites potentiels de phosphorylation situés à l'extrémité N-terminale (Sérine 19) pour la calcium calmoduline kinase, à l'extrémité C-terminale (Sérine 303) pour la caséine kinase et dans la boucle  $M_2M_3$  (Thréonine 161) pour la protéine kinase C.

Le canal TWIK1 génère des courants de très faible amplitude quand il est exprimé dans des systèmes d'expression hétérologue. Comme les autres canaux de cette famille, ils

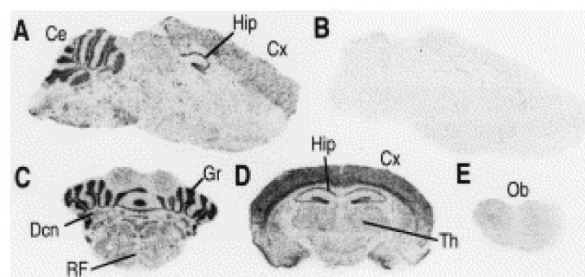
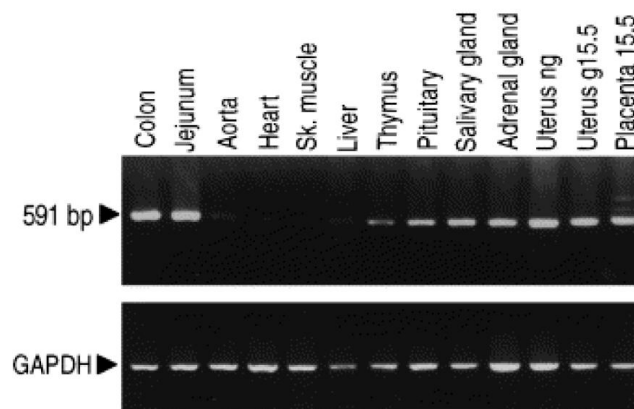




**Figure 18 : Courants TWIK1 enregistrés dans des ovocytes de xénope.**

A. Courants activés par une dépolarisation de -130mV à +50mV par incréments de 20mV à partir d'un potentiel de repos à -80mV.

B. Courbe courant/potentiel mesurée par le même protocole (modifiée d'après *Lesage et al.*, 1997).



**Figure 19 : Localisation de TWIK1 chez la souris adulte.**

1. Expression de TWIK1 dans divers tissus de souris détectée par RTPCR. La GAPDH sert de contrôle (modifiée d'après *Arrighi et al.*, 1998).

2. Localisation de TWIK1 dans le cerveau de souris adulte par hybridation in situ. Coupes sagittales hybridées avec la sonde TWIK1 anti-sens (A) et sens (B). Coupes coronales du cervelet (C), de l'hippocampe et du thalamus (D) et des bulbes olfactifs (E). Ce : cortex du cervelet, Gr : couche granulaire, Cx : néocortex, Gr : couche granulaire du cervelet, Hip : hippocampe, Ob : bulbe olfactif, Th : thalamus (modifiée d'après *Lesage et al.*, 1997).

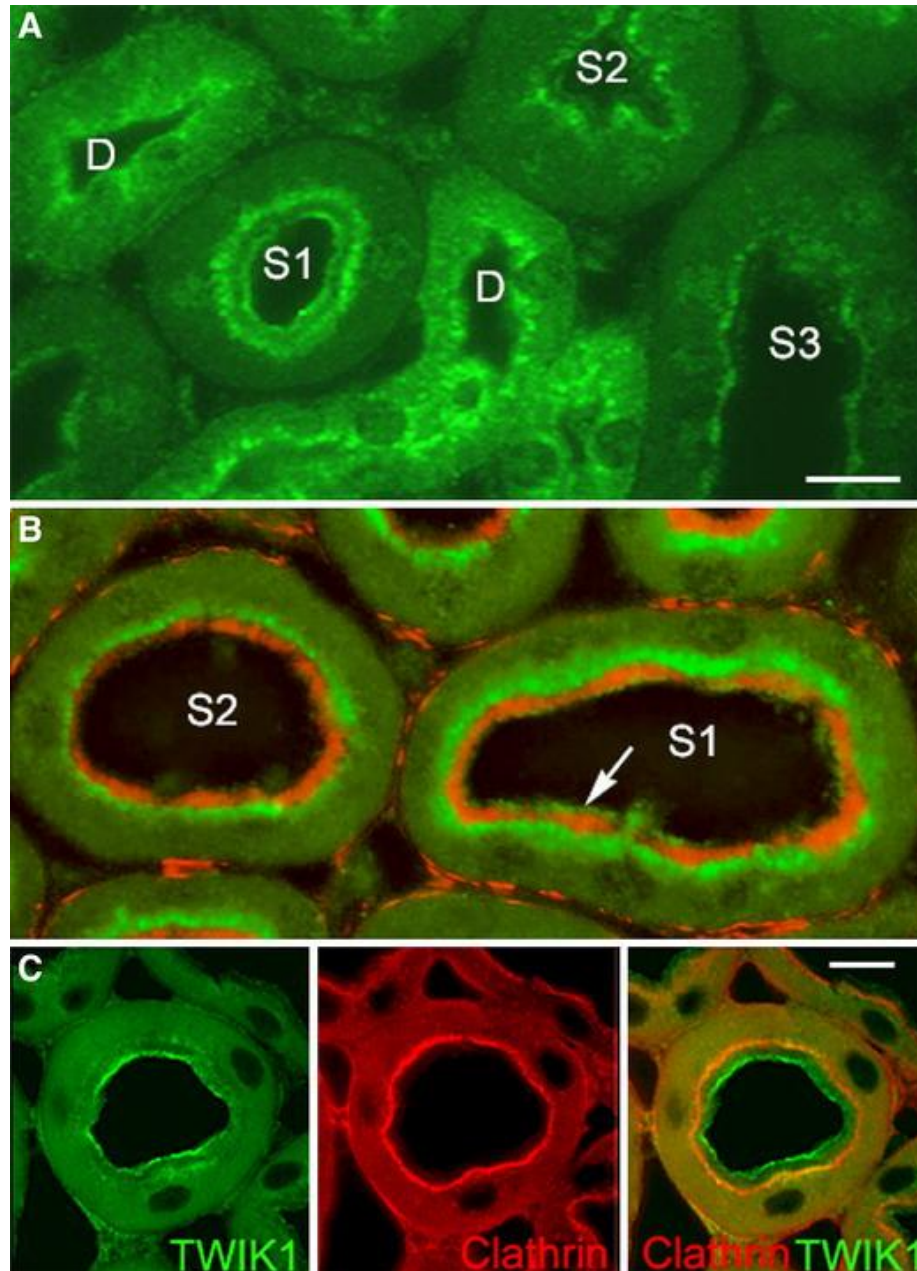
s'activent instantanément et ne s'inactivent pas. Ils ont toutefois la particularité de présenter une rectification entrante pour des potentiels dépolarisés (*Figure 18*). La courbe courant/potentiel est linéaire jusqu'à 0mV puis présente un phénomène de saturation pour des potentiels plus dépolarisés (Lesage *et al.*, 1996). Cette rectification disparaît en absence de magnésium interne. Le pore est donc bouché par un ion magnésium lorsque la membrane se dépolarise. Le canal TWK1 est capable d'amener le potentiel de repos des cellules dans lesquelles il est exprimé proche de celui d'équilibre de l'ion potassium ( $\approx -80$  mV). Lorsque les courants TWIK1 sont enregistrés en patch excisé, il n'est pas observé de modifications, indiquant que le canal ne dépend pas d'éléments intracellulaires, comme l'ATP ou le cytosquelette (Lesage *et al.*, 1996).

### Régulations de TWIK1

Les courants TWIK1 sont inhibés par la quinine et le baryum. Ils sont en revanche insensibles aux traditionnels bloqueurs des canaux potassiques : césium, TEA, 4-AP, apamine, dendrotoxine... TWIK1 est inhibé par l'acidification intra- et extracellulaire (Lesage *et al.*, 1996). Cette inhibition se fait *via* une histidine en position 122, située dans la boucle M<sub>1</sub>P<sub>1</sub> (Rajan *et al.*, 2005). Les courants TWIK1 sont activés par le PMA (phorbol 12-myristate 13-acétate 40 nM) qui est un activateur de la protéine kinase C (Lesage *et al.*, 1997). Comme le canal possède un site consensus de phosphorylation pour la PKC situé en position Thr161, des expériences de mutagenèse dirigée ont été réalisées. Mais la mutation de cette thréonine en alanine n'a pas modifié les propriétés du canal et en particulier sa sensibilité au PMA. La régulation de TWIK1 par la PKC semble donc être indirecte. L'élévation de la concentration de calcium intracellulaire, qui pourrait activer la calcium-calmoduline-kinase 2, n'a aucun effet sur les courants TWIK1.

### Distribution tissulaire et subcellulaire de TWIK1

La sous-unité TWIK1 est très exprimée dans le cerveau, les reins, les poumons et plus faiblement dans le cœur et le placenta (Medhurst *et al.*, 2001). Au cours du développement sa distribution change et son expression n'est détectée qu'à partir du 7<sup>ème</sup> jour de développement (Arrighi *et al.*, 1998). Dans le cerveau la quantité de transcrits TWIK1 est multipliée par 5 entre le stade nouveau-né et le stade adulte, alors que la quantité de ces transcrits double seulement dans les autres organes pendant cette période (Aller and Wisden, 2008). Dans le cerveau, la distribution de TWIK1 n'est pas uniforme et il est très fortement exprimé dans le cervelet, l'hippocampe, le putamen et le noyau réticulaire du thalamus (*Figure 19*). Il est aussi exprimé au niveau de l'oreille interne chez la souris, dans la



**Figure 20 : Localisation de la sous-unité TWIK1 dans le tubule proximal de rein.**

Immunofluorescence réalisée sur les coupes de cryostat (échelle : 10  $\mu$ M).

A. TWIK1 est détecté dans la partie supérieure des microvilli situés au pôle apical des cellules du segment S1 du tubule proximal, à la base des microvilli et dans les compartiments apicaux des segments S2 et S3.

B. Marquage de TWIK1 (en vert) et du cytosquelette d'actine (en rouge), montre l'absence de TWIK1 dans les microvilli, excepté dans le segment S1 (flèche).

C. Double marquage de TWIK1 et de la clathrine dans le tubule proximal. Les deux protéines colocalisent à la base de la bordure en brosse (D'après Nie, *et al.* 2005).

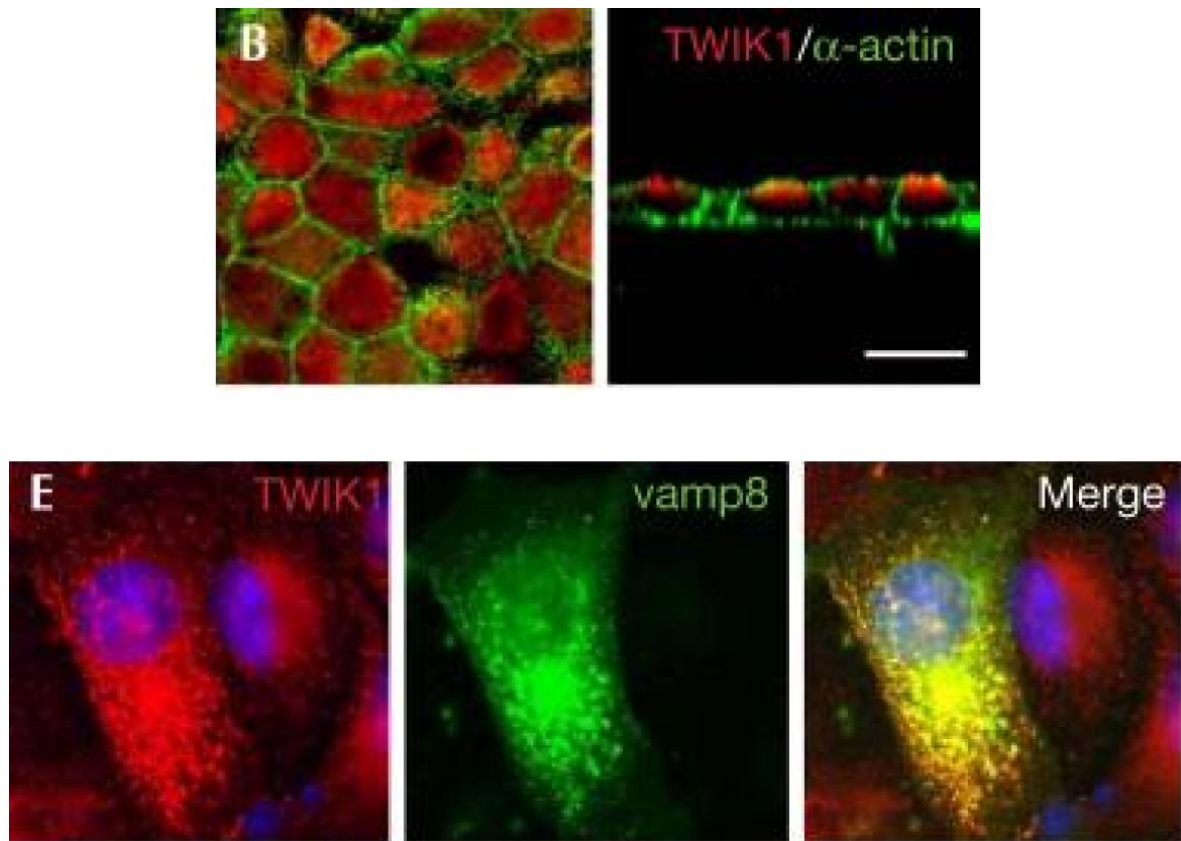
cochlée et le vestibule, et plus particulièrement au niveau de la bordure apicale des cellules épithéliales "non sensorielles" (Nicolas *et al.*, 2003). Dans le rein, il a été montré que la protéine TWIK1 est présente au niveau de la bordure en brosse et du compartiment subapical du tubule proximal. La plus forte expression de TWIK1 est retrouvée dans le segment S<sub>1</sub> du tubule proximal, puis elle décroît en allant vers le segment S<sub>3</sub> (Nie *et al.*, 2005). TWIK1 est également détecté dans le cytoplasme des cellules de l'anse de Henle, le tubule distal et les tubules collecteurs (*Figure 20*).

Afin de déterminer la distribution subcellulaire de TWIK1, des expériences d'immunocytochimie ont été réalisées dans lesquelles TWIK1 et des marqueurs des différents compartiments cytosoliques ont été marqués. Il apparaît que TWIK1 est localisé dans les endosomes de recyclage et colocalise alors parfaitement avec VAMP-8 (Vesicle Associated Membrane Protein 8), un marqueur spécifique de ce compartiment. Ces endosomes de recyclage correspondent au compartiment nucléaire, où l'on retrouve TWIK1 dans les cellules MDCK (Madin Darby Canine Kidney cells) non polarisées (*Figure 21*) (Decressac *et al.*, 2004).

### Rôles physiologiques de TWIK

Au niveau de l'oreille interne, les cellules dans lesquelles le canal TWIK1 a été détecté sont responsables de l'établissement du gradient de potassium, qui est singulier dans cet organe. En effet, il existe dans l'oreille interne un fluide appelé endolymphe, qui est un milieu hyperosmotique très riche en potassium (150 mM). Ce fluide et sa composition sont en partie responsables de la transduction du signal auditif. L'homéostasie de ce liquide particulier est générée et maintenue par des canaux potassiques et notamment le canal KCNQ<sub>1</sub> et sa sous-unité auxiliaire KCNE<sub>1</sub>, par les cellules épithéliales qui expriment aussi TWIK1. Le rôle de TWIK1 n'est pas encore précisément déterminé, mais sa distribution spécifique à la membrane apicale des cellules responsables de l'homéostasie de l'endolymphe suggère qu'il pourrait jouer un rôle dans la régulation de celle-ci (Nicolas *et al.*, 2003). La perte de fonction du complexe KCNQ<sub>1</sub>/KCNE<sub>1</sub> a des conséquences dramatiques sur le fonctionnement de l'oreille interne : surdité, vertiges, maladie de Ménière, et ceci à cause du dérèglement de la balance potassique. Malgré l'expression de TWIK1 dans les mêmes cellules, il semble que ce dernier ne soit pas capable de compenser la perte de KCNQ<sub>1</sub> et de rétablir l'homéostasie de l'endolymphe. TWIK1 pourrait tout de même jouer un rôle secondaire dans l'établissement de ce gradient de potassium.

Plusieurs études ont montré la très forte expression de TWIK1 dans le rein. Une souris invalidée pour ce canal a été générée au laboratoire et a permis d'obtenir de



**Figure 21 : Localisation subcellulaire de TWIK1 dans les cellules MDCK.**

B. Dans les cellules MDCK polarisées, TWIK1 (rouge) est localisé dans un compartiment subapical. Il ne colocalise pas avec le cytosquelette d'actine (vert). A gauche, image confocale plane (xy). A droite, image confocale en coupe (xz).

E. Dans les cellules MDCK non polarisées, TWIK1 (rouge) est détecté dans un compartiment cytosolique (merge), où il colocalise avec VAMP8 (vert) (modifiée d'après Decressac, et al., 2004).

nouveaux renseignements sur le rôle de TWIK1 dans cet organe. Ces souris apparaissent normales du point de vue de leurs caractéristiques générales, leur viabilité et leur croissance. Leur fonction rénale a été évaluée en les plaçant dans des cages métaboliques permettant de mesurer exactement leurs excrétions. Elevées en régime normal, c'est-à-dire avec une quantité de phosphate de 7 g/kg, les souris TWIK1<sup>-/-</sup> ne présentent pas de différences avec les souris sauvages, exceptée une quantité d'urine excrétée plus faible. Lorsque les animaux sont placés pendant 7 jours sous un régime de faible apport en phosphate (0,01 g/kg), il apparaît que les souris TWIK1<sup>-/-</sup> sont moins bien capables de retenir le phosphate dans le rein. En effet, une souris normale va excréter beaucoup moins de phosphate, en le retenant dans le rein, pour maintenir une concentration plasmatique la plus proche possible de la norme, contrairement aux souris TWIK1<sup>-/-</sup>. Outre le transport du phosphate par le rein, il semble que la réabsorption de l'eau dans le rein se fasse moins bien chez les souris TWIK1<sup>-/-</sup> que chez les souris sauvages.

Chez une souris sauvage, une activation de la diurèse par l'injection d'un bloqueur de la vasopressine (une hormone diurétique) augmente de 5 fois la quantité d'urine excrétée. Cet effet est dû à la translocation du transporteur de l'eau (AQ-2 pour aquaporine-2) à la membrane apicale des cellules du tubule collecteur. En revanche, l'augmentation de la quantité d'urine est nettement moins forte chez les souris TWIK1<sup>-/-</sup>, et est associée à un déficit de la translocation d'AQ-2 (Nie *et al.*, 2005). Les souris TWIK1<sup>-/-</sup> présentent donc un défaut dans le transport du phosphate au niveau du tubule proximal et dans le transport de l'eau au niveau des tubules collecteurs du rein. TWIK1 semble donc contribuer au trafic intracellulaire et à l'expression de protéines de transport au niveau de la membrane apicale de certaines structures du rein.

Les astrocytes de l'hippocampe présentent des conductances potassiques de fond qui montrent une courbe voltage/potentiel linéaire. Ces conductances apparaissent seulement lorsque les astrocytes sont matures. Une étude a montré que ces courants potassiques de fond sont générés par des canaux de la famille des K<sub>2p</sub> et seraient en particulier imputés aux canaux TWIK1 et TREK1 (Zhou *et al.*, 2009). En effet les particularités électrophysiologiques de ces courants correspondent à ce que l'on attend pour ces canaux : sensibilité au pH acide, inhibition par le césium et la quinine. Des expériences d'immunohistochimie montrent également la colocalisation de ces canaux avec des marqueurs astrocytaires.

### Expression de TWIK1 à la surface des cellules

Depuis son clonage, l'enregistrement des courants TWIK1 dans des systèmes d'expression hétérologue, excepté l'ovocyte de xénope, a toujours été difficile et a donc



soulevé la question de savoir si le canal était réellement exprimé à la surface des cellules. En effet, les courants enregistrés sont très faibles, et parfois inexistants, notamment dans les systèmes natifs. En 2005, l'équipe du Dr S. Goldstein a publié une étude dans laquelle il suggérait que le canal TWIK1 serait bien exprimé à la membrane plasmique des cellules mais qu'il serait rendu silencieux par la liaison de la protéine SUMO (Small Ubiquitin like Modifier) (Rajan *et al.*, 2005).

La liaison de SUMO se fait de façon covalente sur une lysine située au milieu d'un site consensus. Ce processus se nomme la sumoylation et c'est une modification post-traductionnelle connue pour intervenir principalement dans le trafic nucléo-cytoplasmique de protéines ou la régulation de facteur de transcription (Muller *et al.*, 2001).

C'était alors la première fois qu'un tel processus était observé pour réguler un canal ionique. La mutation d'une lysine, en position 274 donc juste à la sortie du segment S<sub>4</sub>, en glutamate provoque une augmentation drastique du courant TWIK1 enregistré. Le groupe du Dr Goldstein a donc proposé dans cet article que TWIK1 est bien présent à la membrane plasmique des ovocytes de xénope mais que ses courants sont en permanence inhibés par la liaison de la protéine SUMO sur une lysine en position 274 (Rajan *et al.*, 2005).

Après cette publication dont les résultats avaient pour la plupart été obtenu dans l'ovocyte de xénope, notre laboratoire a tenté d'étendre ces résultats aux cellules de mammifères (Felicangeli *et al.*, 2007). Un examen attentif des résultats obtenus a révélé quelques points qui nous ont paru au premier abord plutôt surprenant.

Plusieurs études avaient montré par le passé que le canal TWIK1 était surtout exprimé dans un compartiment subapical dans les cellules polarisées et dans un compartiment périnucléaire dans les cellules non polarisées (Decressac *et al.*, 2004) et non à la membrane plasmique. De plus, la lysine en position 274 n'appartient pas à un site consensus connu pour être une cible de sumoylation. D'autre part, lors des expériences de mutagenèse du Dr S. Goldstein, la lysine, qui est un acide aminé chargé positivement, a été remplacée par un glutamate, un acide aminé chargé négativement. Cette simple modification de charge peut engendrer des conséquences qui n'ont rien à voir avec la nature chimique de l'acide aminé. Enfin pour que le canal soit en permanence inhibé par ce phénomène de sumoylation, il faudrait que cela soit le cas dans un très grand nombre de types cellulaires différents dans lesquels l'expression de TWIK1 est forte mais où l'on n'arrive pas à en enregistrer les courants.

Pour toutes ces raisons, de nouvelles expériences, notamment de Western-Blot, ont été réalisées dans des cellules de mammifère et des ovocytes de xénope, et aucune sumoylation n'a pu être observée quelles que soient les conditions utilisées. Les expériences





de mutagenèse ont également été reproduites, et l'effet de la mutation de la lysine 274 par un glutamate a bien été retrouvé, autant dans les ovocytes de xénope que dans les cellules COS-7. Par contre, lorsqu'une mutation plus conservatrice est faite, c'est-à-dire quand la lysine est remplacée par une arginine, chargée positivement, l'effet sur l'augmentation du courant n'est plus observé. Lorsque l'on regarde plus attentivement le voisinage de la lysine 274, on se rend compte qu'elle est située dans un "cluster" de charges. Ce "cluster" de résidus chargés a été identifié dans d'autres canaux où il est important pour leur activation et inactivation (Chemin *et al.*, 2005). Toutes les tentatives pour trouver une preuve de la sumoylation de TWIK1 ont échoué et il semblerait que l'augmentation du courant observée par l'équipe du Dr Goldstein soit seulement due à un effet de charge. Il apparaît donc que l'incapacité des canaux TWIK1 à produire des courants ne soit pas due à une modification post-traductionnelle de type sumoylation.

Cependant, à ce stade nous ne connaissons toujours pas les mécanismes responsables de la régulation du canal TWIK1 et de sa présence dans les compartiments sous-membranaires. J'ai participé à cette étude au cours de ma thèse, et celle-ci fait l'objet d'un article présenté dans la partie "Résultats : Article2".

#### b. Le canal TWIK2

La sous-unité TWIK2 possède plus de 50% d'identité avec la sous-unité TWIK1. Les séquences sont particulièrement bien conservées au niveau du second pore (Patel *et al.*, 2000). Le canal TWIK2, comme TWIK1 génère des courants de faible amplitude quasi instantanés. En conditions physiologiques, TWIK2 présente une rectification entrante, qui n'est pas dépendante du magnésium, contrairement à TWIK1. Ce canal est inhibé par le baryum, la quinidine et la quinine. Il est également partiellement inhibé par les anesthésiques volatils.

#### c. Le canal KCNK7

Cette sous-unité, clonée chez la souris et l'homme (Salinas *et al.*, 1999) présente environ 40% d'identité avec le canal TWIK1. Elle est principalement exprimée dans le cerveau, les poumons et la moëlle épinière (Medhurst *et al.*, 2001). La particularité de ce canal est de ne pas produire de courants dans les systèmes d'expression hétérologues.

Il est retenu dans le réticulum endoplasmique et aucun des essais réalisés (changement du système d'expression, mutation des motifs potentiels de rétention, expression d'éventuelles protéines partenaires) n'a permis d'exprimer ce canal à la surface des cellules. Des souris invalidées pour le gène KCNK7 ont été produites, mais aucune



différence n'a été observée par rapport aux souris sauvages, que ce soit dans leur sensibilité aux anesthésiques ou à la douleur ou encore dans leurs performances aux tests d'équilibre (Yost *et al.*, 2008).

#### *1.3.3.6 La sous-famille des canaux TREK1, TREK2 et TRAAK*

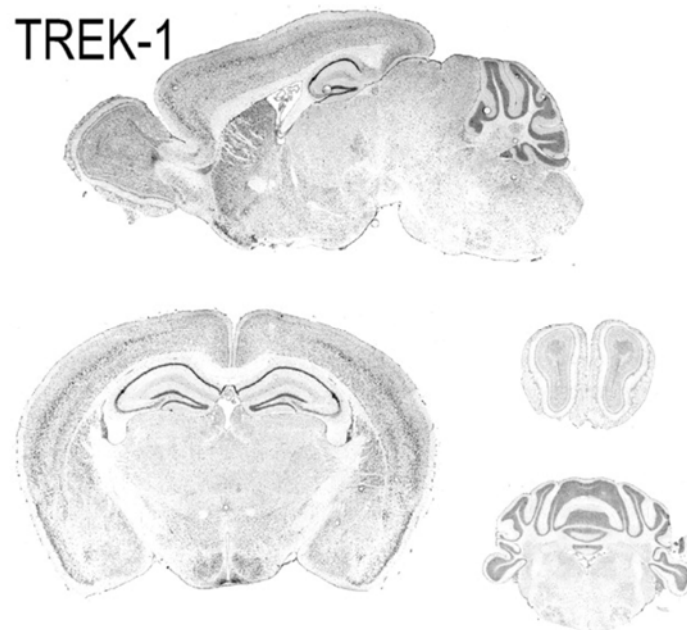
TREK1 (TWIK RElated K<sup>+</sup> channel) est le premier membre de la sous-famille TREK/TRAAK (TWIK Related Arachidonic Acid activated K<sup>+</sup> channel) à avoir été identifié (Fink *et al.*, 1996).

##### a. Le canal TREK1

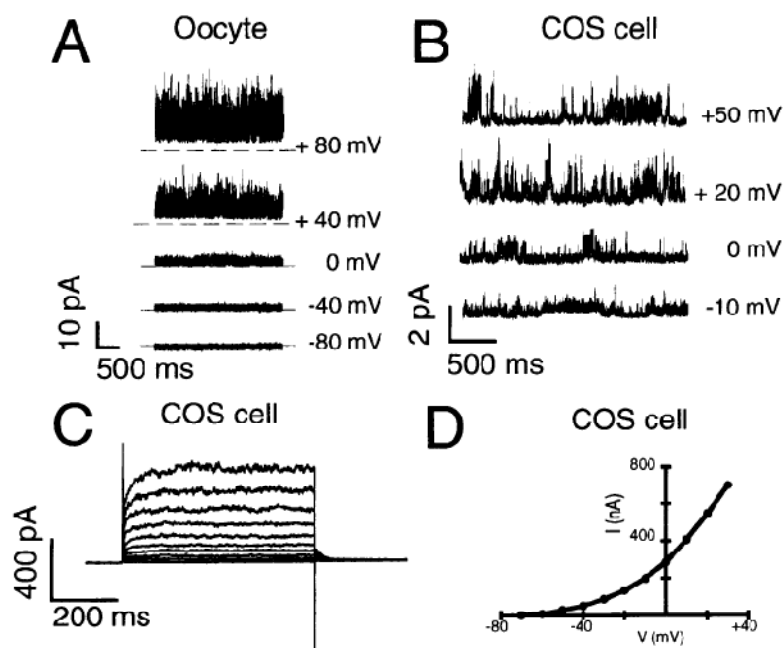
##### Caractéristiques du canal TREK1

La sous-unité TREK1 a une taille de 426 acides aminés pour la protéine humaine et 411 pour la protéine de souris (Fink *et al.*, 1996). L'identité entre TREK1 et TWIK1 est seulement de 26%. Malgré cette faible homologie, leurs topologies sont similaires : 4 segments transmembranaires, 2 boucles P et leurs extrémités N- et C- terminales cytosoliques, la queue C-terminale de TREK1 étant plus longue que celle de TWIK1. Cette sous-unité présente deux sites potentiels de N-glycosylation au niveau de la boucle M<sub>1</sub>P<sub>1</sub>. Elle possède également 4 sites potentiels de phosphorylation pour la protéine kinase C (PKC), deux pour la protéine kinase A (PKA) et deux pour la caséine kinase II. La plupart de ces sites sont situés sur l'extrémité C-terminale. TREK1 est régulé négativement par la PKA et la PKC. L'inhibition du canal par ces deux kinases fait intervenir la phosphorylation de deux sérines en position 333 et 300. Il semble que ces deux résidus puissent être indifféremment le substrat de l'une ou l'autre de ces kinases (Murbartian *et al.*, 2005).

Les domaines P de TREK1 sont plus conventionnels que ceux de TWIK1 puisque leurs séquences signatures sont GFG. TREK1 possède deux domaines P fonctionnels, il doit donc se dimériser pour former un canal fonctionnel (Fink *et al.*, 1996). Plusieurs variants d'épissages de TREK1 ont été découverts, notamment dans le muscle cardiaque (Xian Tao *et al.*, 2006) (Thomas *et al.*, 2008). Les différences se trouvent au niveau de l'extrémité N-terminale qui est plus ou moins longue. Des homologues du canal TREK1 ont été découverts chez d'autres espèces, notamment la levure, mais aussi chez l'Aplysie, où le canal nommé S possède les mêmes particularités, tant de structures que de régulations que TREK1 (Patel *et al.*, 1998).



**Figure 22 : Distribution de TREK1 dans le cerveau de souris adulte.** Hybridation in situ des ARN messagers (modifiée d'après Sandoz, et al., 2008).



**Figure 23 : Enregistrements des courants TREK1 exprimés dans des ovocytes de xénope ou des cellules COS.**

A. et B. Courants TREK1 enregistrés en configuration inside-out dans des ovocytes de xénope (à gauche) ou des cellules COS (à droite).

C. et D. Courants TREK1 enregistrés en configuration cellule entière, par pulse de dépolarisation de -80mV à +30mV par incréments de 10mV (d'après Fink et al., 1996).

### Distribution du canal TREK1

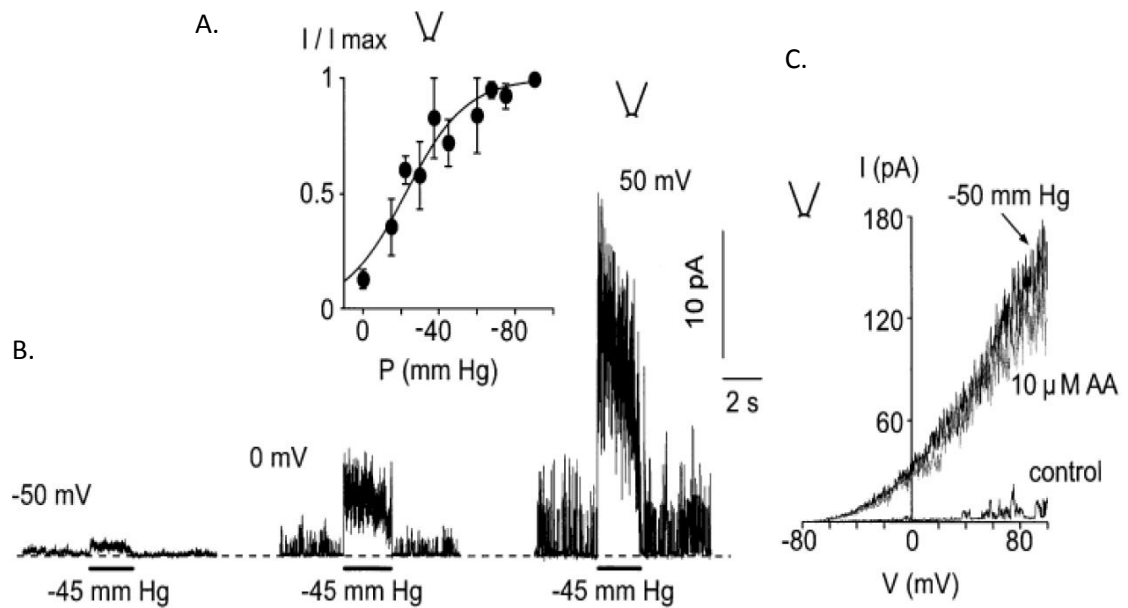
Cette sous-unité est très fortement exprimée dans le système nerveux central (Fink *et al.*, 1996). Cependant sa distribution n'est pas homogène et certaines régions sont plus riches en TREK1 que d'autres. C'est le cas par exemple des interneurons GABA (acide  $\gamma$  aminobutyrique) du noyau caudé et du putamen (Hervieu *et al.*, 2001). La protéine TREK1 est également retrouvée en grande quantité dans le cortex préfrontal, l'hippocampe, l'hypothalamus, le bulbe olfactif, les neurones sensoriels des ganglions spinaux de la moelle épinière (DRG) ou encore les neurones sérotoninergiques du raphé (*Figure 22*) (Medhurst *et al.*, 2001). TREK1 a aussi été détecté dans le tractus intestinal, en particulier dans l'estomac et l'intestin grêle (Meadows *et al.*, 2001) (Talley *et al.*, 2001).

### Caractéristiques biophysiques de TREK1

Lorsque la sous-unité TREK1 est exprimée dans un système d'expression hétérologue, un courant à rectification sortante est enregistré (Fink *et al.*, 1996). Cette rectification est particulière puisqu'elle ne disparaît pas lorsque les concentrations de potassium sont symétriques de part et d'autres de la membrane. Elle est due à un blocage du pore au niveau de sa face externe par un ion magnésium. Ce blocage est levé lorsque la membrane se dépolarise et que son potentiel devient positif (Bockenhauer *et al.*, 2001) (Maingret *et al.*, 2002). Cette rectification semble également due à la légère dépendance au voltage de TREK1. Comme TWIK1, TREK1 est capable d'amener le potentiel de membrane des cellules qui l'expriment à une valeur proche d' $E_K$ , le potentiel d'équilibre du potassium. Quel que soit le système dans lequel ils sont exprimés, les canaux TREK1 s'activent de façon instantanée. L'enregistrement de leurs courants unitaires révèle que ces canaux s'ouvrent par bouffées. La caractéristique principale des canaux TREK1 concerne leur important "flickering", traduisant une oscillation ultrarapide entre les états ouverts et fermés (*Figure 23*). La conductance élémentaire de TREK1 est de 48 pS en condition physiologique et 101 pS en potassium symétrique (Patel *et al.*, 1998).

### Pharmacologie de TREK1

TREK1 est incontestablement le canal à deux domaines P dont on connaît le mieux la pharmacologie et les régulations. Il n'est pas inhibé, comme les autres canaux de cette famille, par les bloqueurs classiques des canaux potassiques : TEA et 4-AP. Il est en revanche inhibé par le baryum, la quinidine, la fluoxétine, qui est un antidépresseur, et la lidocaïne, un anesthésique local (Nayak *et al.*, 2009). TREK1 est activé par une classe importante d'agents



**Figure 24 : Activation de TREK1 par l'étirement membranaire.**

A. Courbe dose-réponse de l'activation de TREK1 par la pression en configuration inside out ( $EC_{50} = -23\text{mmHg}$ ).

B. Effet du potentiel de membrane sur l'activation de TREK1 par une pression négative.

C. Courbes courant/potentiel correspondant à l'expérience présentée en B. (modifiée d'après Patel et al., 1998).

pharmacologiques, les anesthésiques volatils généraux : chloroforme, éther, halothane et isoflurane à des doses cliniques (Patel *et al.*, 1999). Les anesthésiques gazeux, comme l'oxyde d'azote, le xénon ou le cyclopropane activent également TREK1 à des doses cliniques. Tous ces effets semblent être directs car ils sont encore observés en patch excisé, lorsque le canal n'est plus en contact avec le cytosol de la cellule. TREK1 est également fortement activé, mais de façon transitoire, par le riluzole, un agent neuroprotecteur largement utilisé en clinique notamment pour les patients atteints de sclérose latérale amyotrophique (Duprat *et al.*, 2000). Très récemment un peptide nommé Spadin, issu du clivage du prorécepteur à la neurotensine 3 a été identifié comme le premier composé inhibiteur des courants TREK1 (voir §II.3.4) (Mazella *et al.*).

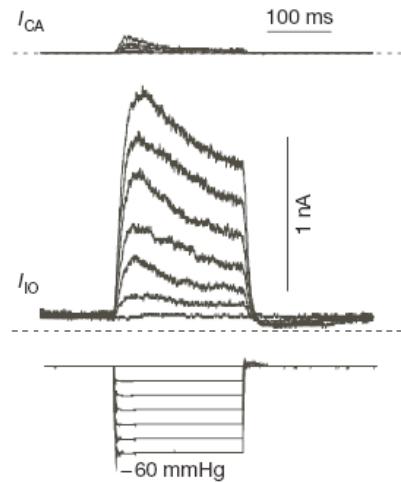
### Régulations de TREK1

Le canal TREK1 peut être activé par un grand nombre de mécanismes, en dehors de l'effet des substances pharmacologiques précédemment citées (pour revue (Honore, 2007)).

#### *TREK1 est un canal mécanosensible*

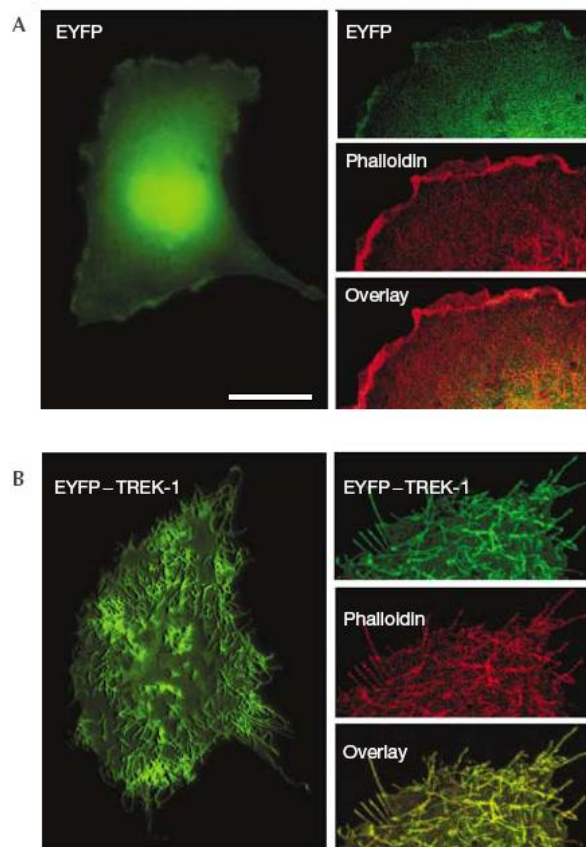
Des études de patch clamp ont montré qu'une pression au niveau de la membrane plasmique augmente de façon réversible les courants TREK1 quelle que soit la configuration utilisée : cellule entière ou inside-out (*Figure 24*) (Patel *et al.*, 1998). Cette sensibilité à la stimulation mécanique ne dépend donc ni des taux de calcium intracellulaire, ni de ceux de l'ATP, suggérant alors une activation directe du canal. Toutefois TREK1 est préférentiellement activé par une pression négative, provoquant une déformation convexe, plutôt que par une pression positive. Une déformation convexe peut être obtenue par une augmentation du volume cellulaire (hypo-osmolarité extracellulaire) ou par l'administration de "crénateurs", tels que le trinitrophénol, qui s'insèrent uniquement dans le feuillet externe de la bicouche lipidique et déforment la membrane. Une déformation concave de la membrane (hyper-osmolarité extracellulaire, chlorpromazine) a tendance à fermer les canaux TREK1. La relation entre l'activité du canal et la pression est une sigmoïde dont la moitié de l'activation maximale est obtenue pour une pression de -36 mm de mercure. Une région chargée, située dans l'extrémité C-terminale des sous-unités TREK1, semble nécessaire pour conférer à ces canaux leur sensibilité à la tension mécanique. Elle n'est toutefois pas suffisante pour transférer cette sensibilité au canal TASK3 (Patel *et al.*, 1998). Le canal TREK1 est désensibilisé après 100 ms de stimulation mécanique sur la membrane, c'est-à-dire que les courants sont inhibés malgré le maintien de la stimulation (Honore *et al.*, 2006). Ce phénomène ne dépend pas du cytosquelette et persiste après l'excision du patch





**Figure 25 : Inhibition tonique de TREK1 par le cytosquelette.**

Le canal est activé par des pressions négatives, de 0 à -60mmHg en configuration cellule attachée (en haut) et 2 minutes après excision du patch (en bas) (modifiée d'après *Lauritzen et al.*, 2005).



**Figure 26 : TREK1 modifie la morphologie des cellules qui l'expriment.**

A et B. Cellules COS transfectées avec EYFP (A) ou TREK1-EYFP (B). Le canal apparaît en vert, et le cytosquelette d'actine en rouge (Phalloïdine). La morphologie du cytosquelette d'actine et de la cellule est modifiée par la présence de TREK1 (modifiée d'après *Lauritzen et al.*, 2005).

suggérant qu'il est seulement dépendant du canal et/ou de la membrane. Des délétions progressives de l'extrémité C-terminale rend le canal plus résistant à l'étirement membranaire, grâce à la perte de cette désensibilisation (Honore *et al.*, 2006).

#### *TREK1 est modulé par le cytosquelette*

Le nombre de canaux TREK1 actifs est augmenté par un traitement avec des agents déstabilisant le cytosquelette d'actine ou après l'excision du patch, permettant de désolidariser le morceau de membrane de son environnement cytoplasmique (*Figure 25*). Le canal TREK1 est donc inhibé de façon tonique par le cytosquelette d'actine (Lauritzen *et al.*, 2005), limitant ainsi son activation par des stimulations mécaniques sur la membrane. Inversement, la surexpression de TREK1 désorganise le réseau du cytosquelette et induit la formation de replis membranaires riches en actine (*Figure 26*). Il semble donc y avoir une interaction dynamique entre TREK1 et le cytosquelette d'actine qui pourrait avoir un rôle dans la synaptogenèse par exemple. Deux résidus sont importants pour la régulation de TREK1 par le cytosquelette, tous deux sont situés au niveau de l'extrémité C-terminale. Il s'agit du glutamate, un résidu chargé en position 306 et de la sérine 333, qui est un site de phosphorylation par la PKA. Lorsque ces deux résidus sont mutés en alanine, le canal TREK1 n'est plus capable de se lier au cytosquelette et son activité est donc plus forte (Lauritzen *et al.*, 2005).

#### *Modulation de TREK1 par les neurotransmetteurs*

TREK1 est inhibé par la stimulation des récepteurs couplés aux protéines G<sub>s</sub> et G<sub>q</sub> (Patel *et al.*, 1998). Lorsque TREK1 est co-transfecté dans un système d'expression hétérologue avec le récepteur à la sérotonine 5-HT<sub>4</sub>, qui est couplé à la protéine G<sub>s</sub>, l'application de sérotonine inhibe les courants. Le second messenger impliqué dans cette régulation est l'AMP cyclique. L'application de l'analogue perméant de l'AMPc permet de mimer ces effets, qui passent par la phosphorylation de la sérine en position 333 *via* la protéine kinase A. Cette sérine est donc impliquée dans la sensibilité à l'AMPc mais aussi dans la liaison au cytosquelette. De la même façon, les courants TREK1 sont inhibés par la liaison du neurotransmetteur sur son récepteur lorsque celui-ci est couplé à la protéine G<sub>q</sub>, comme les récepteurs métabotropiques au glutamate GluR1 et GluR5 (Chemin *et al.*, 2003).

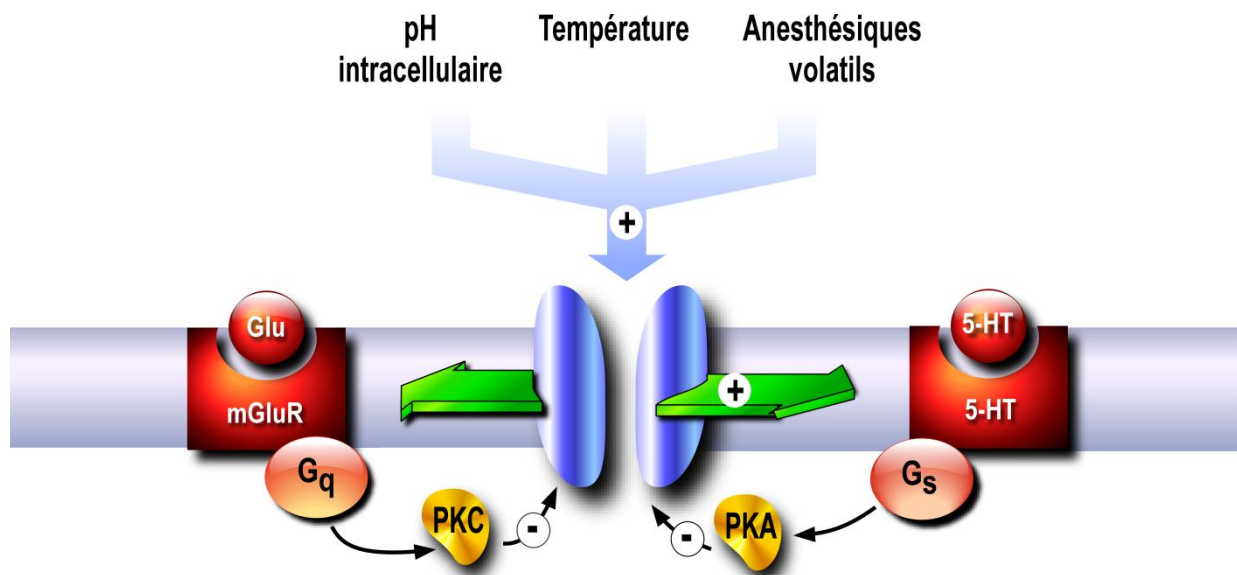


Figure 27 : Schéma représentant les principales régulations du canal TREK1.

### *TREK1 est modulé par la température*

Une augmentation progressive de la température induit une augmentation des courants TREK1 de façon graduelle, dépendante de la température, et complètement réversible (Maingret *et al.*, 2000). La sensibilité maximale est trouvée entre 32 et 37°C, avec une augmentation du courant de 0,9 fois à chaque degré gagné. Ces résultats sont obtenus en configuration cellule entière. Par contre, lorsque le patch est excisé, la sensibilité à la température est perdue, indiquant que ce phénomène repose sur des interactions entre le canal et le cytosol de la cellule. La délétion de la partie C-terminale du canal conduit à la perte de cette sensibilité. Cette région est nécessaire mais pas suffisante puisque son transfert sur le canal TASK3, insensible à la température ne modifie pas sa régulation par la chaleur. TREK1 est très exprimé dans les neurones de DRG, mais aussi dans l'hypothalamus, impliqués dans la régulation de la température laissant supposer que le canal TREK1 joue peut-être un rôle dans la perception de la température (*Figure 27*).

### *TREK1 est sensible aux variations de pH*

Les canaux TREK1 sont activés par l'acidose intracellulaire (Maingret *et al.*, 1999). La diminution du pH intracellulaire convertit ce canal mécanosensible en un canal constitutivement actif à la pression atmosphérique. La protonation d'un résidu d'acide glutamique (E306) situé dans l'extrémité C-terminale de ces canaux est responsable de leur ouverture par le pH acide (Honore *et al.*, 2002).

Récemment le laboratoire a montré que TREK1 est également très sensible aux modifications du pH extracellulaire (Sandoz *et al.*, 2009). Dans une zone proche du pH physiologique, une acidification du milieu inhibe fortement les courants TREK1, alors que l'alcalinisation les augmente. La sensibilité au pH de TREK1 ( $pK = 7,4$ ) est apportée par une histidine conservée dans la sous-unité TREK2. Cette histidine se trouve dans la boucle extracellulaire  $M_1P_1$  en position 126. D'autres résidus situés dans la boucle  $P_2M_4$  semblent également participer à cette sensibilité.

### *Modulation de TREK1 par les lipides cellulaires*

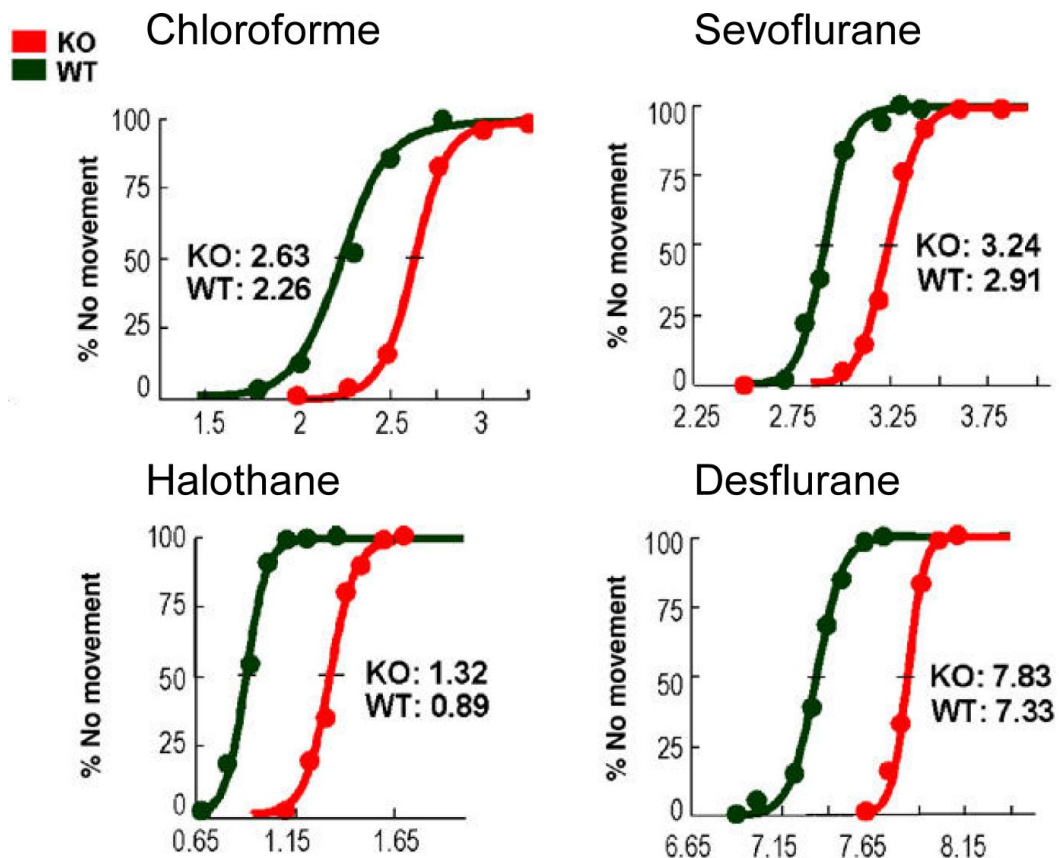
Les acides gras poly-insaturés, tel que l'acide arachidonique activent fortement les courants TREK1 (Patel *et al.*, 1998). Cet effet est toujours observé dans les patches excisés suggérant un effet direct. Les éléments nécessaires à l'activation de TREK1 par ces acides gras sont : une longue chaîne, un grand nombre d'insaturations (les acides gras saturés ne produisent pas d'effet) et une charge négative. Les acides gras poly-insaturés s'insèrent dans



la bicouche lipidique. Ces molécules amphipathiques chargées négativement s'insèrent de façon préférentielle dans le feuillet externe de la membrane plasmique, certainement à cause de la répartition asymétrique des phosphatidylsérines également chargées négativement que l'on retrouve sur le feuillet interne. Cette insertion dans le feuillet externe provoque une déformation convexe de la membrane identique à celle observée lorsqu'une pression négative est appliquée. Inversement, les composés amphipathiques chargés positivement auront tendance à s'insérer dans le feuillet interne et donc à fermer les canaux TREK1. C'est exactement ce qui se passe pour la chlorpromazine. Des expériences de délétion ont été menées pour comprendre l'origine de cette régulation, et il a été montré que l'extrémité C-terminale est impliquée, sans plus de précisions. Le mécanisme de régulation pourrait être commun à l'effet des acides gras poly-insaturés et à la sensibilité mécanique, qui semblent agir de la même façon (Kim, 2003).

Les lysophospholipides extracellulaires, dont la phosphatidylcholine, activent également le canal TREK1 de façon réversible (Maingret *et al.*, 2000). A faible dose, un effet additif est même observé entre l'acide arachidonique et la phosphatidylcholine. L'effet des lysophospholipides est dépendant d'une longue chaîne carbonée et d'une large tête polaire, mais la charge de la molécule n'influe pas (Patel *et al.*, 2001). En fait, c'est la forme conique des lysophospholipides qui est le paramètre central permettant l'activation de TREK1. Au contraire, les lysophospholipides intracellulaires inhibent TREK1. Cette régulation est également gouvernée par l'extrémité C-terminale du canal, mais il n'y a pas de données disponibles concernant les séquences impliquées. Cependant les mécanismes d'activation par les acides gras poly-insaturés et les lysophospholipides sont différents car l'excision du patch stoppe l'activation par ces derniers. L'application de lysophospholipides à large tête polaire pourrait activer un facteur cytosolique, soit par l'activation d'un récepteur, soit par la simple déformation de la membrane (Maingret *et al.*, 2000).

La région qui suit immédiatement le segment M<sub>4</sub> dans la sous-unité TREK1 est, comme nous l'avons vu, particulièrement importante pour le "gating" du canal et pour les mécanismes de régulation. Dans cette zone, se trouve en particulier un résidu glutamate (E306) dont la protonation par l'acidification intracellulaire contrôle la régulation du canal par la pression mécanique et son ouverture par un pH acide. Le motif de charges positives entourant ce résidu interagit avec les phospholipides de la membrane induisant des réarrangements structuraux. Ce sont ces réarrangements qui sont impliqués dans l'ouverture du canal par les stimuli mécaniques, capables de transformer un canal de faible activité à rectification sortante en un canal de fuite à forte conductance. Cette zone post-M<sub>4</sub> contient également deux résidus sérines (S300 et S333) qui peuvent être phosphorylés par



**Figure 28 : Effets de différents anesthésiques volatils sur les souris TREK1<sup>+/+</sup> et TREK1<sup>-/-</sup>.**

L'effet de l'anesthésie est mesuré en fonction de la dose inspirée par l'animal, et de la réponse de la souris à un stimulus douloureux. Le pourcentage d'animaux ne répondant pas à ce stimulus, donc anesthésiés est représenté en ordonnée. Ces expériences ont été réalisées sur les souris TREK1<sup>+/+</sup> (en vert) et TREK1<sup>-/-</sup> (en rouge) (modifiée d'après *Heurteaux et al.*, 2004).

les protéines kinases C et A et qui sont importants pour l'inhibition du canal par les neurotransmetteurs.

### Une nouvelle forme de régulation de TREK1

Jusqu'ici, nous avons vu que TREK1 est régulé par un très grand nombre de stimuli physiques, chimiques mais aussi pharmacologiques. L'hypothèse qui a été faite par le laboratoire il y a quelques années est que TREK1 pourrait également être régulé par des protéines qui lui seraient associées et qui modifieraient alors ses propriétés biophysiques. Cette hypothèse a été vérifiée et validée au laboratoire. Les détails sont présentés dans la seconde partie de cette introduction (§ II.3.4 Les protéines associées aux canaux TREK) (voir §II.3.4)).

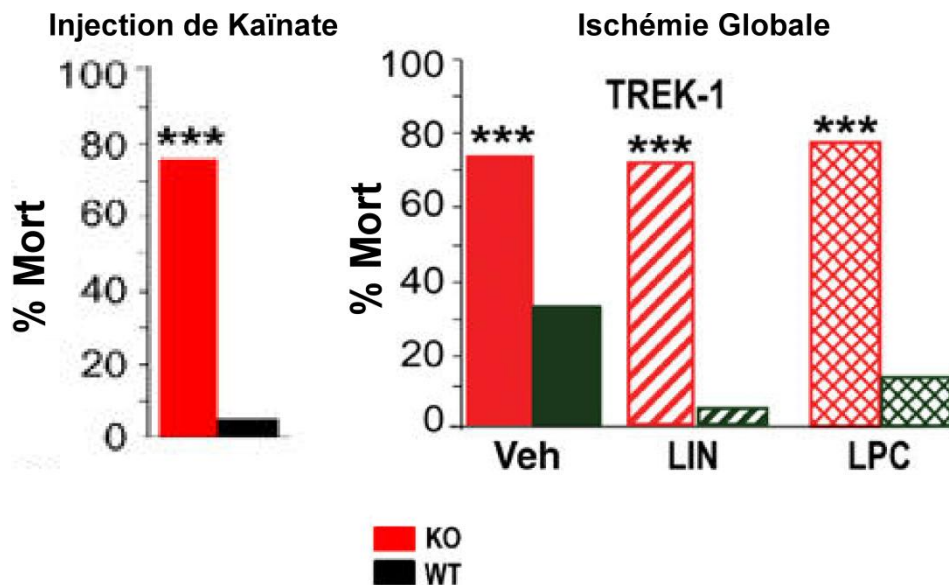
### Rôles physiologiques de TREK1

La plupart des connaissances que nous avons aujourd'hui des rôles physiologiques de TREK1 viennent de l'étude approfondie des souris knockout (KO) pour le canal TREK1 (TREK1<sup>-/-</sup>). Ces souris ont été générées au laboratoire. Elles sont en bonne santé, fertiles, et n'ont pas de différences morphologiques visibles. Mais dans de nombreuses situations, leur comportement sera très différent de celui des souris sauvages.

#### *Dans l'anesthésie*

Une propriété intéressante du canal TREK1 est sa sensibilité aux anesthésiques volatils qui sont capables de l'activer et ceci dans des concentrations utilisées en clinique (Patel *et al.*, 1999). La conséquence de l'activation des courants TREK1 est une hyperpolarisation dans les cellules qui l'expriment. Les études menées sur les souris TREK1<sup>-/-</sup> ont montré que celles-ci sont beaucoup moins sensibles que les souris sauvages à un certain nombre d'anesthésiques, notamment le chloroforme, l'halothane, mais aussi le sevoflurane, le desflurane et l'isoflurane, qui sont les plus utilisés en clinique. Par exemple, à une concentration d'halothane suffisante pour endormir 100% des souris sauvages, aucun effet n'est observé sur les souris TREK1<sup>-/-</sup> (Figure 28) (Heurteaux *et al.*, 2004). Les canaux TREK1 sont donc impliqués dans les phénomènes d'anesthésie par des agents volatils. Les souris TREK1<sup>-/-</sup> restent cependant sensibles aux anesthésiques, mais à des doses plus forte. Ceci est probablement dû à l'effet de ces agents sur d'autres canaux de cette famille, et notamment les canaux TASK qui y sont également sensibles.





**Figure 29 : Rôle neuroprotecteur de TREK1.**

A gauche, taux de mortalité de souris TREK1<sup>+/+</sup> (en noir) et TREK1<sup>-/-</sup> (en rouge) après le déclenchement d'une crise d'épilepsie induite par une injection de kainate.

A droite, taux de mortalité de souris TREK1<sup>+/+</sup> et TREK1<sup>-/-</sup> après une ischémie de globale de 30 minutes, traitées avec de l'acide linoléique (LIN), du lysophosphatidylcholine (LPC) ou rien (VEH). Les animaux sauvages, mais pas les souris KO sont protégés par l'injection d'acide gras (modifiée d'après *Heurteaux et al.*, 2006).

### *Dans la neuroprotection*

L'implication de TREK1 dans les crises épileptiques a été testée par l'injection de kaïnate, un activateur des récepteurs glutamate ou d'un inhibiteur des récepteurs au GABA, le pentylentetrazol (Heurteaux *et al.*, 2004). Les souris TREK1<sup>-/-</sup> se sont révélées beaucoup plus susceptibles à ces crises épileptiques que les souris sauvages. Plus de 75% des souris TREK1<sup>-/-</sup> meurent dans les 3 jours suivant l'injection de kaïnate contre seulement 3% des souris sauvages.

Un autre phénomène générant des dégâts neuronaux importants est l'ischémie. Des souris sauvages et des souris TREK1<sup>-/-</sup> ont subi des ischémies cérébrales bilatérales ou des ischémies de la moëlle épinière. Les souris TREK1<sup>-/-</sup> sont beaucoup plus sensibles que les souris sauvages et leur taux de mortalité dans les 3 jours suivant l'intervention est beaucoup plus fort.

L'injection d'acide linoléique ou de lysophosphatidylcholine avant le kaïnate ou avant l'ischémie induit une forte neuroprotection chez les souris sauvages, réduisant fortement l'impact physiologique des différents traitements (Lauritzen *et al.*, 2000). En revanche, une telle neuroprotection n'est pas du tout retrouvée chez les souris TREK1<sup>-/-</sup> indiquant que l'effet des acides gras polyinsaturés est médié par le canal TREK1. En fait, au cours d'une ischémie, de l'acide arachidonique est relâché par les cellules, le pH intracellulaire devient plus acide et les neurones gonflent. Ces changements pathologiques peuvent contribuer à l'ouverture des canaux TREK1. Cela induit une hyperpolarisation à la fois des neurones présynaptiques (réduisant la libération de neurotransmetteur) et postsynaptiques (augmentant le blocage des récepteurs NMDA par le magnésium) ce qui va protéger les neurones contre l'excitotoxicité induite par le glutamate. Un tel effet n'est plus possible chez des souris qui n'expriment pas le gène TREK1 expliquant les conséquences importantes des traitements et l'absence de sensibilité aux acides gras (Figure 29).

Il faut aussi noter que les canaux TREK1 sont régulés par un nombre important de molécules neuroprotectrices comme le riluzole (Duprat *et al.*, 2000), l'oxyde nitrique et le xénon.

### *Dans la douleur*

Plusieurs des propriétés de TREK1 laissent entrevoir un éventuel rôle de celui-ci dans la perception de la douleur, notamment sa localisation au niveau des neurones de DRG (Dorsal Root Ganglion) de petite taille et de taille intermédiaire connus pour être impliqués dans la nociception. TREK1 est également modulé par des stimuli qui peuvent être



douloureux, comme la pression et la température. L'étude des souris TREK1<sup>-/-</sup> a montré que ces animaux sont plus sensibles à une augmentation de la température qui devient alors douloureuse. C'est la frontière entre une stimulation par la chaleur non douloureuse et une stimulation douloureuse qui est modifiée chez ces animaux (Alloui *et al.*, 2006). Les souris TREK1<sup>-/-</sup> sont également plus sensibles à une stimulation mécanique, c'est-à-dire une même pression ne sera pas ressentie comme douloureuse chez une souris sauvage alors qu'elle le sera chez les souris KO. Ces souris sont également plus sensibles à la douleur provoquée par une inflammation, dont les propriétés sont une augmentation de la température et une hyperalgésie mécanique. TREK1 est également inhibé par une acidification du milieu extérieur et l'acide lysophosphatidique, tous deux connus pour augmenter lors d'une blessure, d'une inflammation ou d'un cancer (Cohen *et al.*, 2009). TREK1 apparaît donc comme un canal important dans la perception polymodale de la douleur, ce qui en fait une cible thérapeutique intéressante.

#### *Dans la dépression*

La sérotonine est depuis longtemps considérée comme le neurotransmetteur impliqué dans les phénomènes de dépression. En effet la plupart des antidépresseurs utilisés, comme la fluoxétine, agissent sur le système sérotoninergique, en inhibant la recapture de la sérotonine dans les neurones. Or TREK1 est régulé par les neurotransmetteurs et notamment la sérotonine *via* ses récepteurs couplés aux protéines G (Patel *et al.*, 1998). De plus TREK1 est particulièrement bien exprimé dans le cortex préfrontal et l'hippocampe, connus pour être impliqués dans la dépression, la mémorisation, mais aussi dans le développement des sentiments de culpabilité et les accès suicidaires. De plus TREK1 est très présent dans des régions qui sont le siège des émotions, comme l'amygdale, le striatum et l'hypothalamus (Heurteaux *et al.*, 2006). Il était alors supposé que TREK1 puisse jouer un rôle dans cette pathologie. L'étude des souris TREK1<sup>-/-</sup> a permis d'en savoir un peu plus sur ces mécanismes. En effet, ces souris présentent une neurotransmission par la sérotonine accrue, et ceci en raison de la perte du contrôle négatif qu'exerce la sérotonine sur son neurone présynaptique. De plus, des tests permettant d'évaluer l'état dépressif des rongeurs ont été réalisés sur des souris sauvages et sur des souris TREK1<sup>-/-</sup>. Les deux souches d'animaux se comportent très différemment. Les souris TREK1<sup>-/-</sup> sont résistantes à la dépression (Heurteaux *et al.*, 2006). En fait, les souris KO présentent le même comportement que les souris sauvages traitées avec un antidépresseur classique de type fluoxétine. TREK1 étant inhibé par la fluoxétine (Kennard *et al.*, 2005), l'action des antidépresseurs pourrait passer en partie par ce canal, expliquant ainsi que la



perte du canal aboutisse à un animal résistant à la dépression, comme s'il était en permanence traité aux antidépresseurs.

#### *Dans la modulation présynaptique*

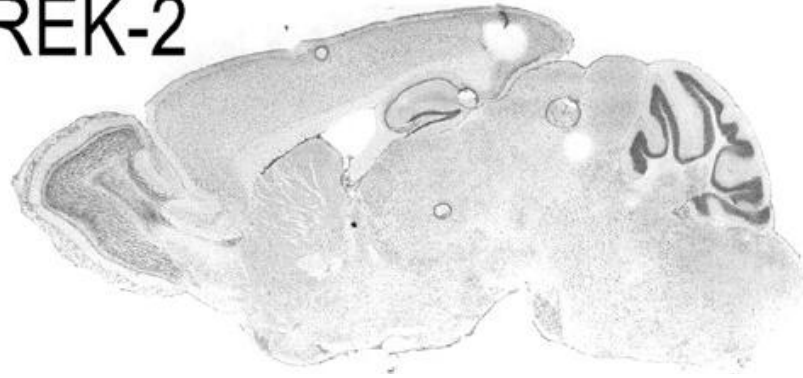
TREK1 est exprimé aussi bien sur les neurones présynaptiques que sur les neurones postsynaptiques (Lauritzen *et al.*, 2000). Au niveau présynaptique, il est attendu que la modulation de TREK1, qui va modifier l'excitabilité cellulaire, affecte la libération de neurotransmetteurs. Le canal TREK1 semble être l'homologue fonctionnel du canal S de l'Aplysie (Patel *et al.*, 1998), qui est impliqué dans une forme simple de mémorisation. Les canaux TREK1 et de type S partagent les mêmes particularités biophysiques : canal de fuite avec une rectification sortante, indépendant du calcium, une conductance unitaire d'environ 50 pS, mais aussi les mêmes régulations, puisque ces deux canaux sont activés par les anesthésiques volatils et l'étirement membranaire, et inhibés par la sérotonine. Lorsque l'on applique de façon répétitive des stimuli non douloureux sur le manteau d'une Aplysie, l'amplitude du réflexe de rétraction branchiale diminue progressivement. A l'opposé de ce phénomène normal d'habituation, l'application d'une stimulation douloureuse augmente fortement l'amplitude du réflexe de rétraction branchiale. L'application de ce stimulus douloureux entraîne par la suite des réponses exagérées à des stimuli anodins. Plusieurs expériences douloureuses espacées dans le temps donneront naissance à une mémoire durable pouvant persister plusieurs jours. Ce phénomène est causé par une facilitation présynaptique de la transmission entre des neurones sensoriels et des neurones moteurs. Les interneurones modulateurs libèrent de la sérotonine, ce qui a pour conséquence d'inhiber le canal S situé sur le neurone présynaptique. L'inhibition de cette conductance de fond conduit à une augmentation de la durée des potentiels d'action, autorisant alors une plus grande entrée de calcium dans le neurone présynaptique, et donc *in fine* à une libération accrue de neurotransmetteurs et à une réponse motrice exacerbée (Byrne and Kandel, 1996). Les similitudes fonctionnelles entre TREK1 et le canal S de l'Aplysie suggèrent un éventuel rôle de ces canaux dans la modulation de la libération de neurotransmetteurs et donc dans les processus de mémorisation chez le mammifère.

#### b. Le canal TREK2

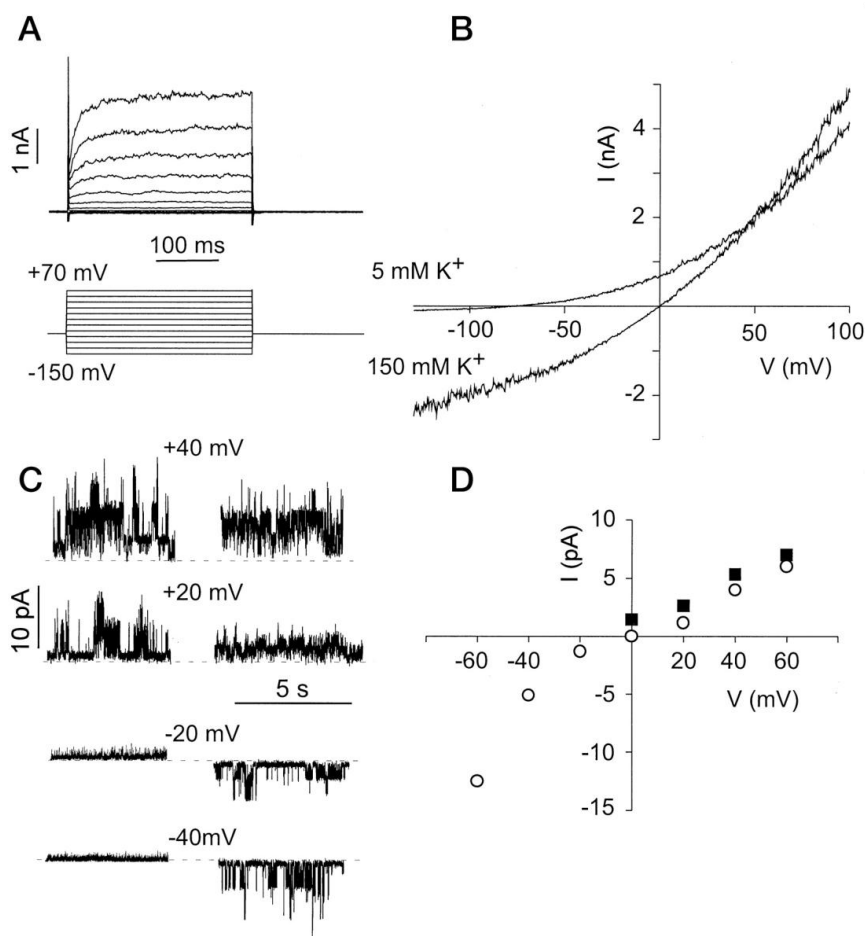
##### Caractéristiques de TREK2

Cette sous-unité a été clonée simultanément chez l'homme et la souris (Bang *et al.*, 2000) (Lesage *et al.*, 2000). Ce gène code pour une protéine de 538 acides aminés qui

# TREK-2



**Figure 30 : Distribution de TREK2 dans le cerveau de souris adulte.**  
Hybridation in situ des ARN messagers (modifiée d'après *Sandoz, et al., 2008*).



**Figure 31 : Propriétés biophysiques des courants TREK2.**

A. Enregistrement en configuration cellule entière d'un courant TREK2 activé par une dépolarisation de -150mV à +70mV par incréments de 20mV.

B. Courbes courant/potentiel en conditions physiologiques ou en conditions de potassium symétrique.

C. Enregistrements de courants unitaires en configuration outside out à différents potentiels de membrane, en conditions de potassium physiologique (à gauche) ou symétrique (à droite).

D. Courbes courants/potentiel de courants unitaires en conditions de potassium physiologique (carrés noirs) ou symétrique (rond blancs) (d'après *Lesage et al., 2000*).

partage près de 75% d'homologie avec le canal TREK1. Sa topologie est la même que celle des autres canaux de cette famille : 4 segments transmembranaires et 2 domaines P. La principale différence entre TREK2 et les autres canaux de sa sous-famille est la taille de son extrémité C-terminale qui est particulièrement longue avec près de 80 acides aminés de plus sur la sous-unité TREK2 que sur TREK1. Chez différentes espèces, plusieurs isoformes issues d'un épissage alternatif du premier exon ont été retrouvées (Gu *et al.*, 2002). Ces variants d'épissage, localisés dans des tissus différents, contribuent probablement à la diversité des  $K_{2P}$ . La sous-unité TREK2 contient deux sites potentiels de N-glycosylation, situés classiquement dans la boucle  $M_1P_1$ . Deux sites potentiels de phosphorylation par la PKA et la PKC ont aussi été identifiés : la sérine 359, qui est l'homologue de la sérine 333 de TREK1 et la thréonine 475.

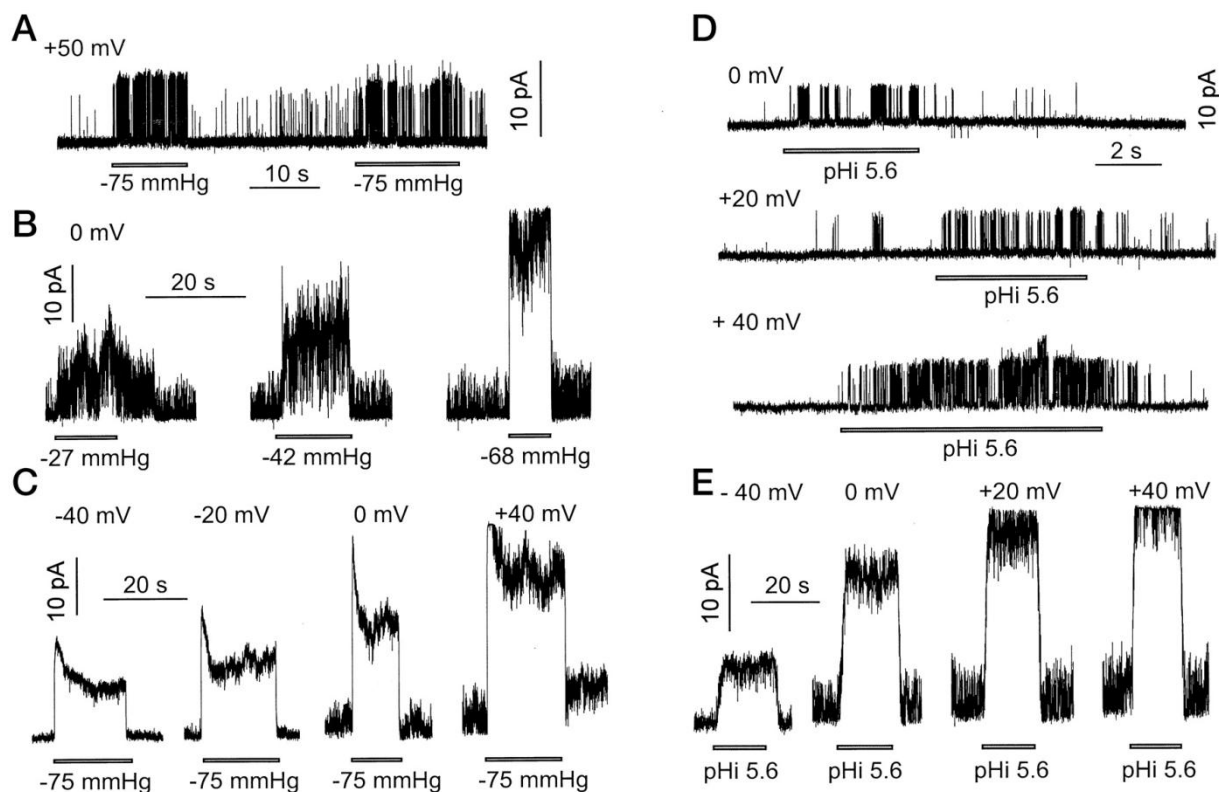
#### Distribution de la sous-unité TREK2

La sous-unité TREK2 est abondamment présente dans le cerveau, mais pas de façon homogène puisque le cervelet, le putamen et le thalamus sont les structures qui l'expriment le plus (*Figure 30*) (Lesage *et al.*, 2000). Certains tissus périphériques expriment également TREK2 comme le foie, les testicules, les reins et le pancréas, ainsi que les neurones de DRG (Kang *et al.*, 2005). Une particularité du canal TREK2 est de ne pas être totalement exprimé à la membrane plasmique. Dans les systèmes d'expression hétérologue, une partie des protéines TREK2 est retenue dans le cytoplasme des cellules, sans explication à ce jour.

#### Caractéristiques électrophysiologiques de TREK2

Les sous-unités TREK2 produisent des courants qui ne présentent pas de cinétique d'activation et qui ne s'inactivent pas. La courbe courant/potentiel montre une rectification sortante qui persiste en condition de potassium symétrique, comme pour le canal TREK1 (Lesage *et al.*, 2000). La particularité de ce canal est que les enregistrements des courants unitaires montrent une rectification entrante et non pas sortante lorsque le potentiel membranaire se dépolarise. Cependant lors d'une dépolarisation la probabilité d'ouverture de chaque canal augmente, ce qui explique la rectification sortante observée sur les courants macroscopiques (*Figure 31*). Enfin, comme les autres canaux de cette sous-famille, l'activité des canaux TREK2 est caractérisée par une ouverture en bouffées et un important "flickering".

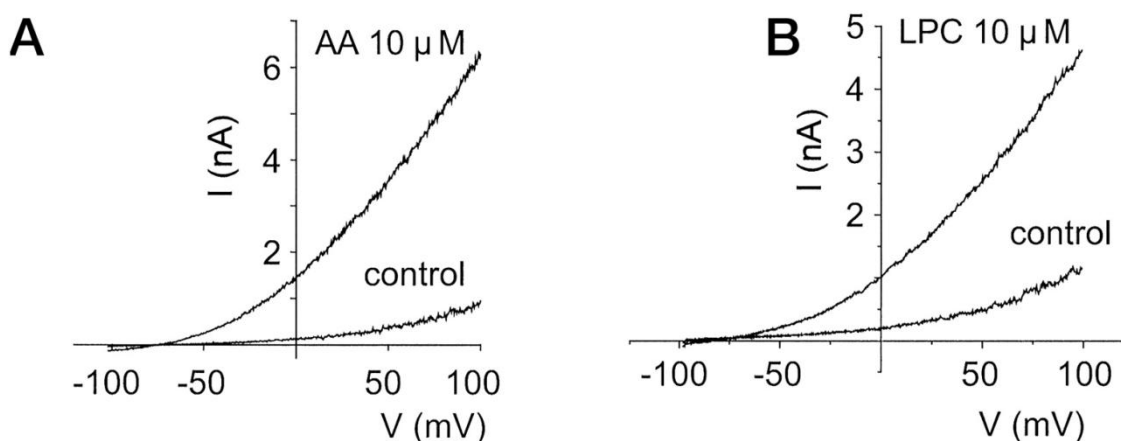




**Figure 32 : Activation de TREK2 par l'étirement membranaire et par l'acidification intracellulaire.**

A, B et C. Activation réversible de TREK2 par l'étirement membranaire.

D, E et F. Activation réversible de TREK2 par une acidification intracellulaire (d'après Lesage et al., 2000).



**Figure 33 : Activation de TREK2 par les acides gras polyinsaturés et le lysophosphatidylcholine.**

Courbes courant/potentiel obtenues par des rampes de potentiels (AA : acide arachidonique, LPC : lysophosphatidylcholine) (modifiée d'après Lesage et al., 2000).

## Régulations du canal TREK2

Comme la plupart des autres  $K_{2P}$ , TREK2 est insensible au TEA, à la 4-AP et au baryum. La quinidine inhibe partiellement les courants TREK2. De plus comme TREK1, TREK2 est activé par des doses cliniques d'anesthésiques volatiles généraux, tels que l'halothane, le chloroforme et l'isoflurane (Lesage *et al.*, 2000). TREK2 est également activé transitoirement par l'agent neuroprotecteur riluzole (Duprat *et al.*, 2000). Il est aussi stimulé par le zinc (Kim *et al.*, 2005). Ces canaux sont sensibles à la température (Kang *et al.*, 2005), une augmentation de la température de 24 à 37°C provoque une augmentation de 14 fois des courants TREK2 tous les 10°C, et ceci grâce à une augmentation de la probabilité d'ouverture des canaux. Les canaux TREK2 sont donc actifs à des températures physiologiques. Cette régulation a été observée dans des systèmes d'expression hétérologues, mais aussi dans des systèmes natifs, des neurones granulaires et des neurones sensoriels de DRG.

Comme TREK1, les courants TREK2 sont activés de façon réversible par une acidification du milieu intracellulaire et par l'étirement membranaire (*Figure 32*) (Lesage *et al.*, 2000). L'activation par l'étirement membranaire est plus forte lorsque la pression appliquée sur la membrane est négative. Elle ne présente aucune dépendance vis-à-vis du cytosquelette ou du cytosol. Ces canaux sont également activés par les acides gras polyinsaturés et les lysophospholipides (*Figure 33*). Les courants TREK2 sont inhibés par une augmentation de l'AMPc, ce qui est dû à leur couplage négatif à la PKA qui phosphoryle la sérine 359. Comme chez son homologue TREK1, la partie C-terminale est primordiale pour toutes ces régulations, puisque lorsqu'elle est délétée ou remplacée par l'extrémité C-terminale de TASK3, le canal n'est plus sensible au pH, aux acides gras et à l'étirement membranaire (Kim *et al.*, 2001). TREK2 est également modulé par de nombreux neurotransmetteurs *via* leurs récepteurs couplés aux protéines G. Les courants TREK2 sont par exemple inhibés par l'activation d'une protéine  $G_s$ , mais activés par les protéines  $G_i$  et  $G_q$  (Lesage *et al.*, 2000).

La seule différence de régulation entre TREK1 et TREK2 est leur sensibilité au pH extracellulaire. Alors que TREK1 est inhibé par une acidification, TREK2 est lui activé (Sandoz *et al.*, 2009). Le résidu responsable de ce phénomène est l'histidine H151 qui est l'homologue de l'histidine 126 de TREK1. La différence de comportement est due à des résidus situés dans la boucle  $P_2M_4$  qui ne possèdent pas les mêmes charges dans les deux sous-unités.



### Rôles physiologiques de TREK2

Les régulations de TREK2 sont pour la plupart identiques à celles de TREK1, laissant supposer que les deux canaux remplissent les mêmes rôles. Les souris TREK2<sup>-/-</sup> ont été beaucoup moins étudiées que les souris TREK1<sup>-/-</sup> d'où le peu de données disponibles. Cependant les caractéristiques électrophysiologiques et la localisation de TREK2 nous laissent croire qu'il joue un rôle dans l'établissement et le maintien du potentiel de repos membranaire. Sa régulation par les protéines G suppose que ce canal peut contrôler l'excitabilité cellulaire en réponse à des neurotransmetteurs. Il a d'ailleurs été montré que les courants TREK2 contribuent au courant potassique  $I_{KSO}$  enregistré dans les neurones granulaires de cervelet (Han *et al.*, 2002). Ce courant est responsable de l'établissement du potentiel de repos et du contrôle de l'excitabilité cellulaire dans ces cellules. Il semble que TREK2 participe à ce courant qui repose sur trois autres courants, dont TASK1, TASK3 et un autre canal encore inconnu.

On peut également imaginer que la localisation presque exclusivement neuronale du canal et sa sensibilité aux acides gras poly-insaturés et aux lysophospholipides lui permettent de jouer un rôle dans la neuroprotection. De plus, TREK2 est sensible à l'étirement membranaire, à la température et aux variations de pH ce qui laisse présager un rôle dans la perception douloureuse, notamment dans les neurones sensoriels de DRG (Kang *et al.*, 2005). TREK2 est sans doute impliqué dans les mécanismes d'anesthésie de par sa sensibilité aux anesthésiques volatils généraux. Les canaux TREK2 sont également exprimés par les astrocytes dans lesquels ils sont responsables d'une grande conductance potassique de fond et de l'établissement du potentiel de repos (Gnatenco *et al.*, 2002). Ceci suggère que TREK2 pourrait être impliqué dans l'homéostasie des astrocytes, et être important notamment dans les états pathologiques.

Enfin, comme nous l'avons vu, le canal S de l'Aplysie est très proche des deux canaux TREK. Or ce canal est connu pour jouer un rôle important dans des processus de mémorisation simple. TREK2 pourrait également jouer un rôle similaire dans les structures qui l'expriment, comme le cervelet.

### c. Le canal TRAAK

#### Caractéristiques de la sous-unité TRAAK

Le troisième membre de cette sous-famille correspond au canal TRAAK, cloné chez la souris et chez l'homme (Fink *et al.*, 1998) (Lesage *et al.*, 2000). Ces sous-unités ont une taille de 398 et 393 acides aminés respectivement. Une particularité de la sous-unité TRAAK est



qu'il existe un variant d'épissage tronqué, appelé TRAAKt (Fink *et al.*, 1998). Ce variant semble posséder un seul segment transmembranaire et une extrémité C-terminale correspondant à la boucle  $M_1P_1$ . Il ne possède pas de boucle P, et ne peut donc pas former un canal potassique. De façon surprenante, les deux transcrits sont exprimés à des niveaux quasiment identiques dans les tissus. Ceci suggère un rôle de cette forme tronquée de TRAAK, qui n'a pour le moment pas été élucidé.

La sous-unité TRAAK a la même topologie que les autres canaux de cette famille : deux boucles P et quatre segments transmembranaires. Elle possède une cystéine en position 52 (dans la boucle  $M_1P_1$ ), qui est l'homologue de la cystéine C69 retrouvée chez TWIK1 chez qui elle est responsable de la dimérisation des sous-unités par un pont disulfure. TRAAK contient également deux sites potentiels de N-glycosylation et de nombreux sites potentiels de phosphorylation par la PKA (383), la PKC ou la caséine kinase II. L'extrémité C-terminale de TRAAK est plus grande que celles des canaux TREK, mais l'homologie est assez faible.

#### Distribution de TRAAK

Son expression se limite quasi exclusivement au système nerveux : le cerveau, et plus particulièrement l'amygdale, le noyau caudé, le putamen, la moelle épinière et la rétine (Fink *et al.*, 1998). Le canal TRAAK est transporté dans les extrémités des nerfs périphériques et notamment dans le nerf sciatique (Bearzatto *et al.*, 2000).

#### Caractéristiques électrophysiologiques de TRAAK

Lorsqu'il est exprimé dans des systèmes d'expression hétérologues, TRAAK produit des courants instantanés qui ne s'inactivent pas (Lesage *et al.*, 2000). Ces courants sont insensibles au potentiel de membrane. Ils présentent, comme les courants TREK1 et TREK2, une rectification sortante en condition physiologique. Cependant lorsque les concentrations de potassium sont symétriques, TRAAK perd cette rectification sortante, laissant place à une courbe courant/potentiel linéaire, identique à celle prévue par l'équation de GHK. Cette propriété est unique dans cette sous-famille car les courants TREK conservent leur rectification quelles que soient les concentrations de potassium. Par contre, de la même façon que les courants TREK, l'activité de TRAAK est caractérisée par un "flickering" important, et une conductance unitaire d'environ 45 pS en conditions physiologiques (Fink *et al.*, 1998). En outre, comme les autres canaux fonctionnels de cette famille, les canaux TRAAK permettent d'amener le potentiel de membrane de la cellule qui l'exprime à des valeurs proches du potentiel d'équilibre du potassium (Lesage *et al.*, 2000).



### Régulations du canal TRAAK

Les courants TRAAK sont sans surprise insensibles aux bloqueurs classiques des canaux potassiques : TEA, 4-AP, césium, charybdotoxine et dendrotoxine. Ils ne sont pas non plus sensibles aux modifications de concentrations intracellulaires de calcium, aux modifications de pH intra- ou extracellulaire ou encore à l'activation de la PKA et de la PKC (Fink *et al.*, 1998). Contrairement à plusieurs autres canaux de cette famille, les canaux TRAAK sont insensibles aux anesthésiques volatils généraux comme le chloroforme. Par contre, ils sont activés de façon réversible, dose-dépendante et directe par les acides gras poly-insaturés, tels que l'acide arachidonique ou l'acide linoléique.... Seuls les acides gras insaturés sont capables de produire cet effet (Fink *et al.*, 1998; Lesage *et al.*, 2000). Le riluzole active également les courants TRAAK de façon durable, ce qui est différent de son effet sur les canaux TREK (Duprat *et al.*, 2000).

Le canal TRAAK est comme les autres canaux de cette sous-famille, activé par un étirement membranaire (Maingret *et al.*, 1999). Une pression négative sur la membrane plasmique ou l'incubation avec un agent crénateur, le trinitrophénol, induisent une activation des courants. Ce canal est donc activé par une déformation convexe de la membrane plasmique. Une désorganisation du cytosquelette, par des agents pharmacologiques ou par l'excision du patch, a montré que TRAAK est inhibé de façon tonique par le cytosquelette (Maingret *et al.*, 1999). Cependant, même lorsque le canal n'est plus en contact avec le cytosquelette, dans un patch excisé par exemple, il est toujours sensible à la stimulation mécanique, indiquant que ces deux stimulations ne dépendent pas des mêmes mécanismes (Maingret *et al.*, 1999). Les lysophospholipides de forme conique activent également les canaux TRAAK par le même mécanisme que pour les canaux TREK1 (Maingret *et al.*, 2000). Comme les canaux TREK, les canaux TRAAK sont sensibles à la température (Kang *et al.*, 2005). Leurs courants sont augmentés lorsque la température passe de 24°C à 42°C. Ils sont donc actifs à des températures physiologiques. L'augmentation des courants globaux résulte en fait d'une augmentation de la probabilité d'ouverture de ces canaux lorsque la température augmente. Cette régulation a été observée dans des systèmes d'expression hétérologues, mais aussi dans des systèmes natifs, des neurones granulaires et des neurones sensoriels de DRG.

### Rôles physiologiques de TRAAK

La sensibilité de TRAAK aux acides gras polyinsaturés et aux lysophospholipides pouvait laisser présager un rôle neuroprotecteur de ce canal. Jusqu'à présent les





expériences réalisées sur les souris TRAAK<sup>-/-</sup> ont montré qu'elles ne sont pas plus sensibles aux épilepsies ou aux ischémies que les souris sauvages (Heurteaux *et al.*, 2004).

Les canaux TRAAK sont fortement exprimés dans les petits neurones sensoriels de DRG. Ils sont activés par une augmentation de la température, avec une activité maximale entre 37 et 42°C, et par la stimulation mécanique. Ces caractéristiques font de TRAAK un bon candidat pour participer à la perception douloureuse. Et effectivement, les souris TRAAK<sup>-/-</sup> présentent une hypersensibilité à la pression et aux températures chaudes et froides (Noel *et al.*, 2009). En fait ces souris perçoivent comme douloureuses des stimulations qui ne le sont pas pour les souris sauvages. Le rôle des canaux TRAAK dans ces neurones semble donc être de réduire la sensation douloureuse lorsqu'ils sont ouverts. Leur inhibition, soit en délétant le gène, soit en les inhibant par des températures très basses ou très hautes vont rendre les animaux plus sensibles à la douleur.

Nous voyons donc que le canal TRAAK, qui est relativement proche de TREK1 est toutefois régulé de manière très différente. Leurs rôles sont également assez différents même si TRAAK a été moins largement étudié que TREK1 pour le moment. Les différences peuvent également s'expliquer, en partie du moins, par la faible homologie qui existe entre ces canaux au niveau de l'extrémité C-terminale, qui est comme nous l'avons vu le siège de très nombreuses régulations.



## **II LES PROTEINES ASSOCIEES AUX CANAUX POTASSIQUES**

Nous avons vu dans la première partie la grande diversité génique de canaux potassiques. L'activité de la plupart de ces canaux est régulée par toutes sortes de stimuli : des molécules chimiques, des protéines kinases qui peuvent phosphoryler certains résidus des canaux ou encore par des variations de la composition des milieux intra- ou extracellulaire : modification du pH, de la concentration de calcium ou d'ATP...

Cependant, il existe d'autres façons de moduler les canaux potassiques. L'association de protéines peut modifier non seulement l'activité de différents canaux potassiques, mais aussi leur adressage, leur expression à la membrane plasmique ou encore leur localisation subcellulaire.

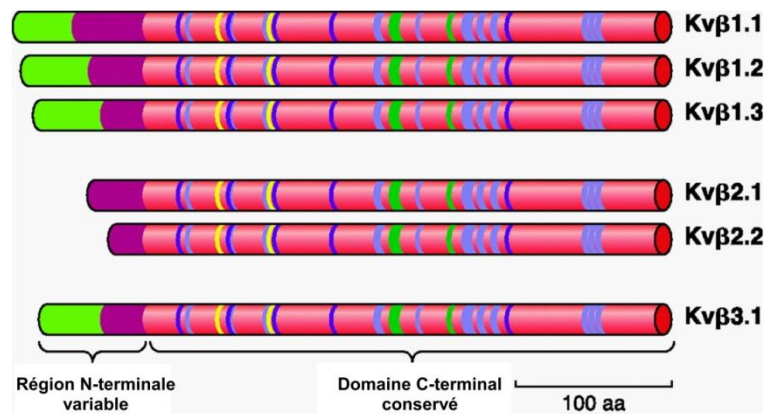
Les protéines capables d'interagir et de réguler les canaux potassiques peuvent être de nature très variées.

### **II.1 LES PROTEINES ASSOCIEES AUX CANAUX POTASSIQUES A 6 SEGMENTS TRANSMEMBRANAIRES**

La majorité des cellules eucaryotes expriment une grande diversité de canaux potassiques voltage-dépendants (Kv). Dans les cellules excitables, neuronales ou musculaires, les canaux Kv régulent la génération et la durée des potentiels d'actions, la fréquence de décharge et la libération de neurotransmetteurs. Dans les cellules non-excitables, ces canaux participent à la régulation du volume cellulaire, la sécrétion hormonale ou encore la prolifération et l'apoptose. Cette famille de canaux est particulièrement régulée par toute sorte de stimuli, mais leur association avec diverses protéines apporte un niveau supplémentaire de diversité et de régulation à ces courants potassiques (pour revue (Pongs and Schwarz, 2010)).

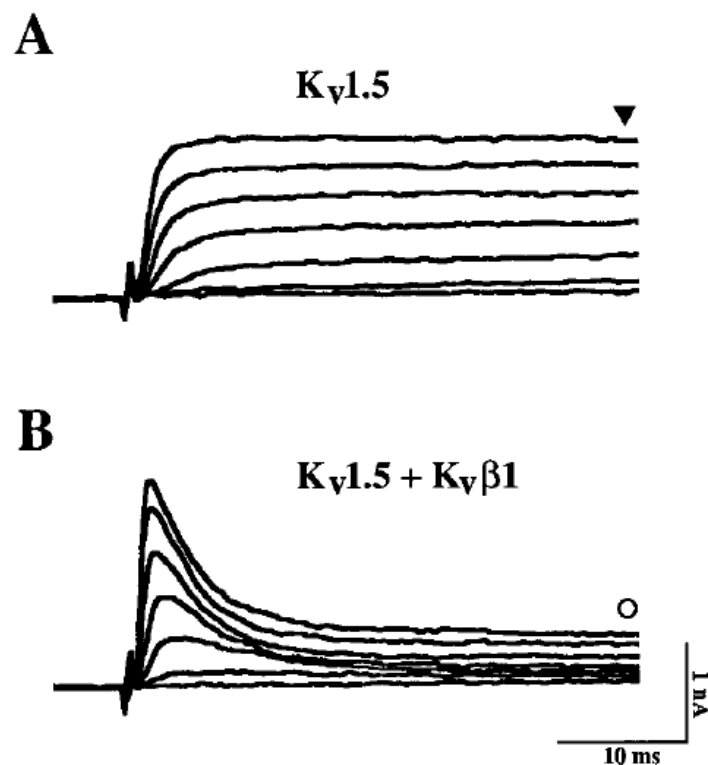
#### **II.1.1 Les sous-unités Kv<sub>β</sub>**

Les sous-unités Kv<sub>β</sub> ont été identifiées et purifiées en même temps que les sous-unités Kv<sub>α</sub> grâce à la très forte affinité entre ces deux protéines. Les sous-unités Kv<sub>β</sub> sont des



**Figure 34 : Diagramme représentant les domaines conservés des protéines de la famille  $Kv_{\beta}$ .**

La région N-terminale variable contient le domaine d'inactivation de type N (vert). La région C-terminale conservée contient les séquences impliquées dans l'interaction avec  $Kv_{\alpha}$  (lignes vert foncé) et le site actif de l'oxydo-réductase. Les résidus catalytiques sont indiqués en jaune, les domaines de liaison au substrat en violet, et les domaines de liaison du cofacteur en bleu (modifiée d'après Pongs *et al.*, 2010).



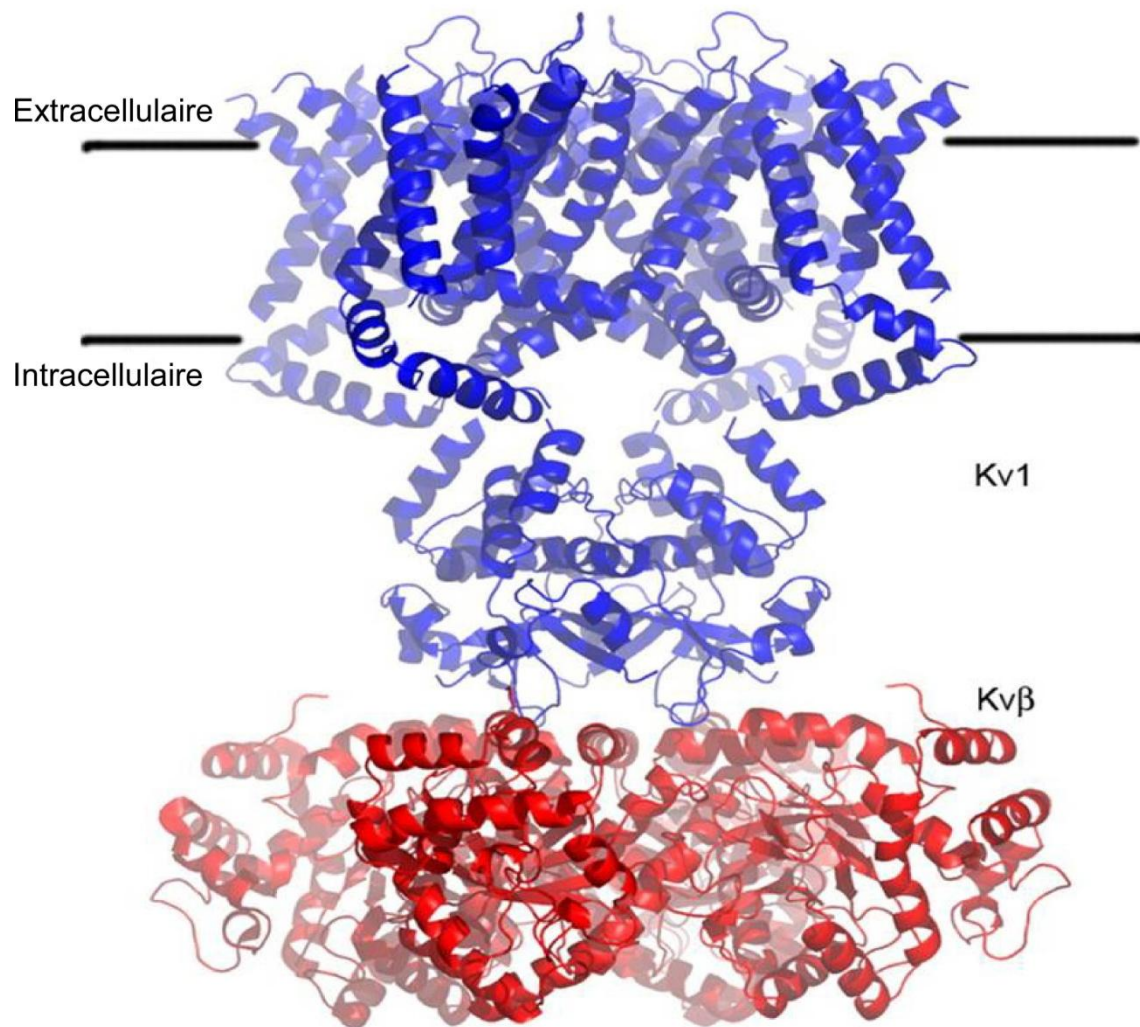
**Figure 36 :  $Kv_{\beta 1}$  est responsable de l'inactivation rapide des courants  $Kv_{1.5}$ .**

Enregistrements de courants  $Kv_{1.5}$  en configuration cellule entière en présence ou non de la sous-unité  $Kv_{\beta 1}$ . Les courants sont activés par une dépolarisation de la cellule de 200mS (Sewing *et al.*, 2006).

protéines cytosoliques d'environ 40 kDa. Il fut démontré très rapidement que les canaux Kv sont organisés en octomères de 4 sous-unités  $\alpha$  et 4 sous-unités  $\beta$ , ce qui fut confirmé plus tard par la structure cristallographique du complexe (Gulbis *et al.*, 1999). Le séquençage, partiel dans un premier temps, a permis d'identifier d'autres protéines  $Kv_\beta$  grâce à l'étude des bases de données. Chez les mammifères, il existe trois gènes qui codent pour ce type de sous-unités  $\beta$  :  $Kv_{\beta 1}$ ,  $Kv_{\beta 2}$  et  $Kv_{\beta 3}$  (Leicher *et al.*, 1996; Schultz *et al.*, 1996). Les deux premiers génèrent des variants d'épissage, dont la variabilité se situe exclusivement au niveau de l'extrémité N-terminale. Malgré ces disparités le cœur de la protéine, d'environ 330 acides aminés, est très conservé, avec plus de 80% d'identité entre les différentes isoformes (Figure 34). L'interaction entre les deux sous-unités apparaît très tôt dans le processus de synthèse protéique, dans le réticulum endoplasmique (Sewing *et al.*, 1996). Le site d'interaction se situe à l'extrémité N-terminale de  $Kv_\alpha$  au niveau d'acides aminés très conservés parmi la famille des sous-unités  $Kv_{1\alpha}$  (Figure 35) (Gulbis *et al.*, 2000). Ceci explique la spécificité d'interaction entre les sous-unités  $Kv_\beta$  et la sous-famille de canaux  $Kv_{1\alpha}$ . Les sous-unités  $Kv_\alpha$  sont capables de s'organiser en hétéromultimères, ce qui semble être également le cas des sous-unités  $Kv_\beta$ , du moins in vitro (Xu *et al.*, 1998). Même s'il est probable que certaines combinaisons ne soient pas réalisables, il existe une multitude de combinaisons  $\alpha_4/\beta_4$  qui participent à la grande diversité des courants potassiques.

Le premier rôle identifié de cette interaction est un effet régulateur de  $Kv_\beta$  sur les propriétés biophysiques du canal  $Kv_{1\alpha}$ . La co-expression de  $Kv_{\beta 1}$  avec des sous-unités  $Kv_\alpha$  non-inactivantes, telles que  $Kv_{1.1}$  et  $Kv_{1.5}$ , leur apporte une inactivation de type N (Figure 36) (Sewing *et al.*, 1996).  $Kv_{\beta 1.1}$  est également capable d'augmenter la vitesse d'inactivation de canaux qui s'inactivent, comme  $Kv_{1.4}$ .  $Kv_{\beta 3.1}$  fonctionne en diminuant le temps de déactivation du canal  $Kv_{1.5}$  et en modifiant sa sensibilité à la PKA.  $Kv_{\beta 2}$  n'est en revanche pas capable d'induire une inactivation de type N à elle seule (Weng *et al.*, 2006). Par contre, elle est capable d'augmenter la vitesse d'inactivation de  $Kv_{1.4}$  (Torres *et al.*, 2007). L'étude de la structure de  $Kv_\beta$  a montré que son extrémité N-terminale était longue et peu structurée, ce qui lui permet de se comporter comme un domaine d'inactivation capable d'obstruer le pore du canal, sur le principe du système "ball and chain" (Gulbis *et al.*, 2000). La sous-unité  $Kv_{\beta 2}$  ne possède pas cette extrémité N-terminale ce qui explique sa différence de fonctionnement par rapport aux autres  $Kv_\beta$ .

A l'heure actuelle, cet effet direct des sous-unités  $Kv_\beta$  sur le gating des canaux  $Kv_\alpha$  est un peu controversé. En effet, plusieurs études ont montré que les propriétés d'inactivation des canaux Kv sont particulièrement sensibles à l'environnement protéique mais surtout lipidique (Schmidt and MacKinnon, 2008). La plupart des expériences sont réalisées dans des conditions de surexpression dans des systèmes d'expression hétérologue, il est alors difficile



**Figure 35 : Représentation d'un complexe de 4 sous-unités  $\alpha$  interagissant avec 4 sous-unités  $\beta$ .**

Les sous-unités  $\alpha$  du canal Kv<sub>1</sub> sont représentées en bleu et les sous-unités Kv $\beta$  en rouge (modifiée d'après *Weng et al.*, 2006).

de reconstituer l'environnement physiologique du canal. Certains de ces paramètres ne sont pas maîtrisés et pourraient être responsables en partie des effets observés.

De plus, d'autres études ont montré que l'effet de  $Kv_{\beta}$  sur la vitesse d'inactivation des canaux  $Kv_{\alpha}$  pourrait dépendre d'une autre de leurs propriétés : une activité enzymatique d'oxydoréduction. Effectivement, l'étude détaillée des séquences de  $Kv_{\beta}$ , ainsi que leur structure tridimensionnelle montrent qu'elles appartiennent à une grande famille d'enzymes, les aldo-keto reductase (AKR), qui sont capables de réduire les aldéhydes ou les cétones en alcool grâce à l'oxydation d'un cofacteur (Weng *et al.*, 2006).

Les sous-unités  $Kv_{\beta}$  possèdent toutes les caractéristiques de cette famille d'enzyme, y compris un site actif potentiellement fonctionnel. Chaque sous-unité  $Kv_{\beta}$  possède une poche très structurée formée de 8 hélices  $\alpha$  et 8 feuillets  $\beta$  parallèles appelée TIM (triose phosphate IsoMerase), que l'on retrouve chez les AKR (Gulbis *et al.*, 1999). De plus, le site catalytique de ces enzymes est composé de 4 résidus particulièrement bien conservés au sein de cette famille, et qui sont également présents dans les sous-unités  $Kv_{\beta}$ .  $Kv_{\beta}$  est aussi capable de lier les cofacteurs classiques des AKR qui sont le NADPH et le  $NADP^{+}$ . Plusieurs études réalisées *in vitro* ont montré que les sous-unités  $Kv_{\beta}$  possèdent bel et bien une activité enzymatique, puisqu'elles sont capables de catalyser la réduction d'une grande variété de substrats (Tipparaju *et al.*, 2008).

Cependant, le substrat cellulaire et physiologique des sous-unités  $Kv_{\beta}$  reste à découvrir. *In vitro*, les caractéristiques de leur activité enzymatique sont proches de celles observées pour les autres enzymes de cette famille en termes de spécificité de substrat mais aussi de vitesse de réaction. Malgré sa conformation en tétramère l'activité catalytique de  $Kv_{\beta}$  ne montre pas de coopération allostérique. Même si le substrat n'a pas été identifié, plusieurs études ont montré que l'activité catalytique et l'activité du domaine d'inactivation de  $Kv_{\beta}$  sont couplées (Tipparaju *et al.*, 2005) (Bhatnagar *et al.*, 2003). En effet, la mutation de résidus dans le site actif ou la substitution de NADPH par  $NADP^{+}$ , le cofacteur oxydé abolit la capacité qu'avait  $Kv_{\beta 1.1}$  à apporter une inactivation de type N au canal  $Kv_{1.5}$ . La liaison de NADPH ou  $NADP^{+}$  est associée à une conformation différente de la protéine. Seule  $Kv_{\beta}$  liée à NADPH est capable de moduler les propriétés d'inactivation des canaux  $Kv_{\alpha}$ .

La présence d'une telle activité enzymatique associée aux canaux  $Kv_{\alpha}$  pourrait permettre de coupler la régulation cellulaire de l'oxydoréduction au "gating" du canal lui apportant alors la capacité d'osciller entre deux modes, une inactivation rapide ou aucune inactivation. Ce couplage peut s'effectuer de deux façons.

La première consiste à réguler l'activité enzymatique en fonction de l'activité électrique de la cellule. La sous-unité  $\alpha$  servirait de sous-unité régulatrice couplant son





activation à un changement conformationnel lui-même capable d'induire un réarrangement de l'enzyme. Celle-ci serait alors activée et pourrait catalyser son substrat. Cela produirait un couplage direct entre l'activité électrique de la cellule et l'état chimique intracellulaire.

La seconde possibilité repose sur le fait que l'état d'oxydoréduction et en particulier le rapport des concentrations intracellulaires en cofacteurs vont, *via* un changement conformationnel, modifier les propriétés biophysiques du canal (Gulbis *et al.*, 1999). Cette dernière hypothèse semble la plus probable et la plus largement acceptée même si sa démonstration n'a pas été faite *in vivo*. Elle repose en partie sur le constat que  $Kv_{\beta 1.2}$  apporte au canal  $Kv_{1.4}$  une sensibilité à l'hypoxie (Perez-Garcia *et al.*, 1999), or le ratio  $NADP^+/NADPH$  dépend de la concentration intracellulaire en oxygène. La fixation de l'un ou l'autre de ces cofacteurs à  $Kv_{\beta}$  va alors modifier la conformation du canal et moduler ses propriétés biophysiques en réponse à l'état d'oxydoréduction de la cellule (Bhatnagar *et al.*, 2003).

Malgré l'assemblage précoce des différentes sous-unités, il semble toutefois que cette association ne soit pas nécessaire à l'expression correcte et efficace du canal  $Kv_{1\alpha}$  à la membrane plasmique. De la même façon les tétramères  $Kv_{\beta}$  peuvent exister en l'absence de  $Kv_{1\alpha}$ . La composition exacte des complexes  $Kv_{1\alpha}/Kv_{\beta}$  dans les systèmes natifs n'est pas connue, mais un assemblage réversible pourrait avoir des conséquences intéressantes pour la régulation d'une cellule (Gulbis *et al.*, 1999; Gulbis *et al.*, 2000).

L'interaction entre  $Kv_{1\alpha}$  et  $Kv_{\beta}$  a une autre conséquence puisque, dans certains cas,  $Kv_{\beta}$  augmente l'expression à la surface du canal auquel elle est associée dans des systèmes d'expression hétérologue. C'est le cas notamment de  $Kv_{\beta 1.2}$  qui augmente la quantité de sous-unités  $Kv_{1.2}$  exprimées à la membrane plasmique (Shi *et al.*, 1996). Une étude récente a également montré le rôle de  $Kv_{\beta}$  dans l'adressage du canal  $Kv_1$  dans l'axone de neurones d'hippocampe en culture (Gu *et al.*, 2003).  $Kv_{1.2}$  perd sa localisation axonale lorsque  $Kv_{\beta 2}$  est absent. De plus  $Kv_{\beta 2}$  suffit à adresser de façon spécifique dans l'axone une autre protéine. Puis, ce même groupe a montré que l'adressage spécifique de  $Kv_{\beta}$  et par conséquent de  $Kv_{1\alpha}$  au niveau de l'axone était dû à la liaison de  $Kv_{\beta}$  à d'autres protéines, notamment EB1 (End-Binding protein 1), une protéine liée aux microtubules, ou encore le complexe KIF3 (Kinesin superFamily protein 3)/Kinésine II considéré comme le moteur responsable du déplacement des vésicules sur les microtubules (Gu *et al.*, 2006). L'hypothèse est que  $Kv_{1\alpha}$  et  $Kv_{\beta 2}$ , suite à leur assemblage dans le réticulum, sont réunis avec EB1 dans les mêmes vésicules de transport. Ces vésicules vont se déplacer le long des microtubules vers les axones grâce au système KIF3/Kinésine II. Dans ce cas, le rôle de  $Kv_{\beta}$  est de servir d'intermédiaire entre le canal auquel elle est associée et d'autres protéines responsables de son adressage par exemple dans ce cas précis.



**Figure 37** : Structure tridimensionnelle du domaine PDZ3 de PSD-95 (*Jemth et al., 2007*).

La localisation et la structure de  $Kv_{\beta}$ , qui fournit une grande surface d'interaction profondément ancrée dans le cytoplasme des cellules laissent suggérer un éventuel rôle de protéine chaperonne. D'autres protéines, comme des kinases, des phosphatases, ou encore des protéines du cytosquelette, pourraient alors interagir avec  $Kv_{\beta}$  afin de réguler le canal  $Kv_{1\alpha}$ . Une interaction a par exemple été montrée *in vitro* entre  $Kv_{\beta 2}$  et les protéines ZIP1 et ZIP2 (PKC-Zeta Interacting Protein) (Gong *et al.*, 1999), capables de lier la PKC.  $Kv_{\beta}$  fait donc le lien entre la protéine effectrice et le canal  $Kv_{1\alpha}$ .

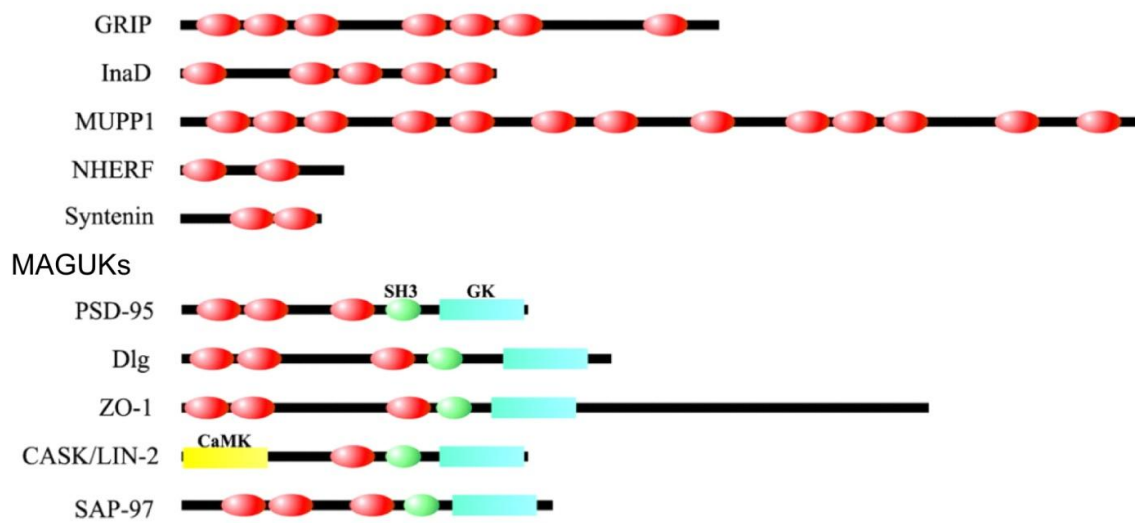
L'activité des canaux  $Kv_{1\alpha}$  peut être grandement modifiée par les différentes sous-unités  $\beta$ , en augmentant la quantité de canaux à la membrane plasmique ou encore en modulant les vitesses d'inactivation de ces canaux. Mais la fonction physiologique d'une telle interaction est particulièrement complexe et reste encore mal comprise. La seule connaissance que nous ayons aujourd'hui vient de l'étude de souris invalidées pour les gènes  $Kv_{\beta 1}$  et  $Kv_{\beta 2}$ . Les souris  $Kv_{\beta 1}^{-/-}$  présentent des déficits d'apprentissage et de mémorisation (Need *et al.*, 2003; Murphy *et al.*, 2004). Les souris  $Kv_{\beta 1}^{-/-}/Kv_{\beta 2}^{-/-}$  ont quant à elle une durée de vie plus courte, une augmentation de l'excitabilité neuronale, et souffrent de crises d'épilepsies (Connor *et al.*, 2005).

Les canaux  $Kv_{1\alpha}$  interagissent donc, avec une très forte affinité, avec une sous-unité partenaire qui produit de multiples effets sur ces canaux. Cependant, de très nombreuses questions restent à élucider, notamment le rôle physiologique de cette interaction, mais également le substrat cellulaire de l'aldo-keto reductase portée par  $Kv_{\beta}$  et son effet précis sur le canal.

### II.1.2 Les protéines à domaine PDZ

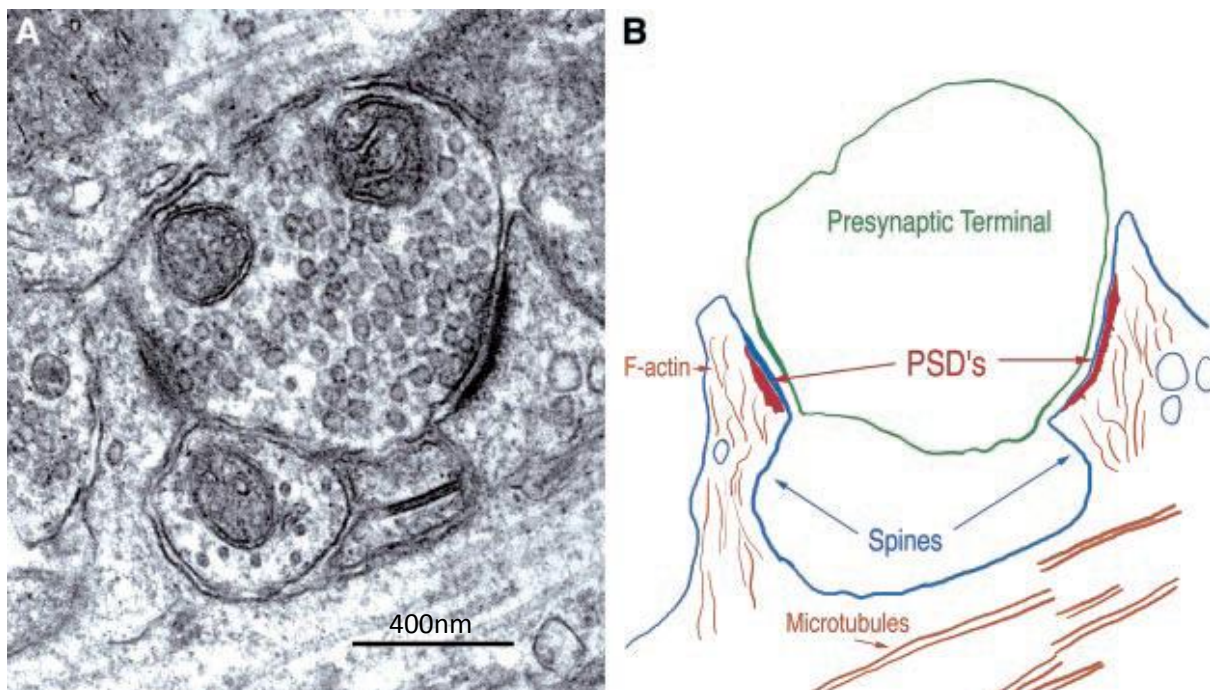
Les domaines PDZ sont classiquement impliqués dans les interactions protéine-protéine dans de très nombreux organismes, de la bactérie à l'homme (Ponting, 1997). La découverte de ces domaines a été réalisée sur la base de répétitions de séquences retrouvées dans plusieurs protéines de signalisation. Ils ont été nommés dans un premier temps GLGF (Gly-Leu-Gly-Phe), en raison du motif de résidus répétés que l'on retrouve dans la partie N-terminale des protéines qui le possèdent, ou encore DHR (Discs large Homology Region) du nom de la première protéine possédant ce domaine trouvée chez *Drosophila Melanogaster*. Peu après, il a pris le nom de domaine PDZ, d'après les trois premières protéines possédant ce domaine découvertes : PSD-95,Dlg (Disc Large region) et ZO-1 (Zonula Occludens 1). Ce domaine PDZ est une séquence de 80 à 90 acides aminés arrangés dans une forme globulaire et compacte (Figure 37).

### Protéines à domaines PDZ multiples



**Figure 38 : Diversité des protéines à domaine PDZ.**

Quelques exemples de protéines à domaine PDZ. Les domaines PDZ (en rouge) peuvent être retrouvés en un ou plusieurs exemplaires, et parfois associés à d'autres domaines d'interaction protéine-protéine. GK : guanylate kinase, CaMK : calcium-calmoduline dependant protein kinase (modifiée d'après *Hung et al.*, 2002).



**Figure 39 : Image de microscopie électronique d'une synapse (*Kennedy et al.*, 2000).**

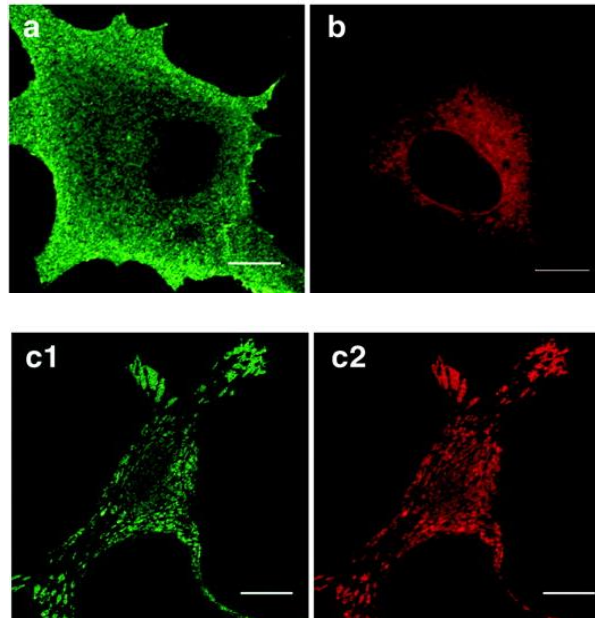
Les protéines qui comptent au moins un domaine PDZ sont très nombreuses : plus de 400 chez l'homme et la souris (Schultz *et al.*, 2000). La quasi majorité des protéines possédant un domaine PDZ sont des protéines cytosoliques, qui peuvent contenir uniquement le domaine PDZ, en un ou plusieurs exemplaires, mais qui peuvent également posséder d'autres domaines particuliers. C'est le cas notamment d'une famille de protéines à domaine PDZ, les MAGUK (Membrane-Associated guanylate kinases) qui possèdent aussi un domaine SH3 (SRC Homology domain) et un domaine GK (Guanylate Like Domain) (Gomperts, 1996) (*Figure 38*).

Les domaines PDZ sont de véritables modules d'interaction protéine-protéine. Leur fonction première est de reconnaître des motifs spécifiques, présents le plus souvent au niveau de l'extrémité C-terminale de récepteurs ou de canaux. Il existe différentes séquences reconnues par les domaines PDZ, qui peuvent même être d'autres motifs plus internes, comme par exemple des domaines en "doigts  $\beta$ ", qui miment une extrémité C-terminale (Eldstrom *et al.*, 2002).

Ces protéines à domaines PDZ se comportent comme des protéines adaptatrices qui permettent de réunir différents composants, récepteurs et molécules de signalisation intracellulaire par exemple, au sein d'un même complexe. Une des protéines à domaine PDZ la plus étudiée est la protéine PSD-95 (Post-Synaptic Density 95). Elle appartient à la famille des MAGUK, qui comporte 3 autres membres : Chapsyne 110, SAP-102 (Synapse-associated protein 102) et SAP-97. Elle possède à son extrémité N-terminale deux résidus cystéine, qui ne sont pas impliqués dans la liaison de motifs PDZ. En revanche, ces cystéines permettent à plusieurs PSD-95 de s'associer et de former des multimères (Hsueh *et al.*, 1997). Cette faculté est essentielle pour la liaison de plusieurs protéines en un même lieu et en même temps (Hsueh and Sheng, 1999). Les MAGUKs sont principalement retrouvées dans le système nerveux central, et particulièrement au niveau des synapses.

Les synapses sont composées d'une terminaison pré-synaptique chargée de vésicules de neurotransmetteurs qui sont libérées sous l'effet d'un stimulus particulier au niveau d'une région spécialisée de la synapse appelée "zone active". Les molécules de neurotransmetteurs relâchées dans la fente synaptique rejoignent la membrane post-synaptique au niveau d'une seconde zone particulière, la densité post-synaptique (ou Post-Synaptic Density, PSD) (*Figure 39*). L'efficacité de la transmission synaptique repose sur l'organisation ordonnée de complexes protéiques situés de part et d'autre de la fente synaptique. Cette organisation précise est assurée en partie par les protéines à domaine PDZ de la famille des MAGUK.

Une interaction entre la protéine PSD-95 et un canal ionique a été identifiée pour la première fois en 1995, avec la mise en évidence à la fois *in vitro* et *in vivo* de l'association



**Figure 40 : PSD-95 modifie la localisation de  $Kv_{1.4}$  dans un système d'expression hétérologue.**

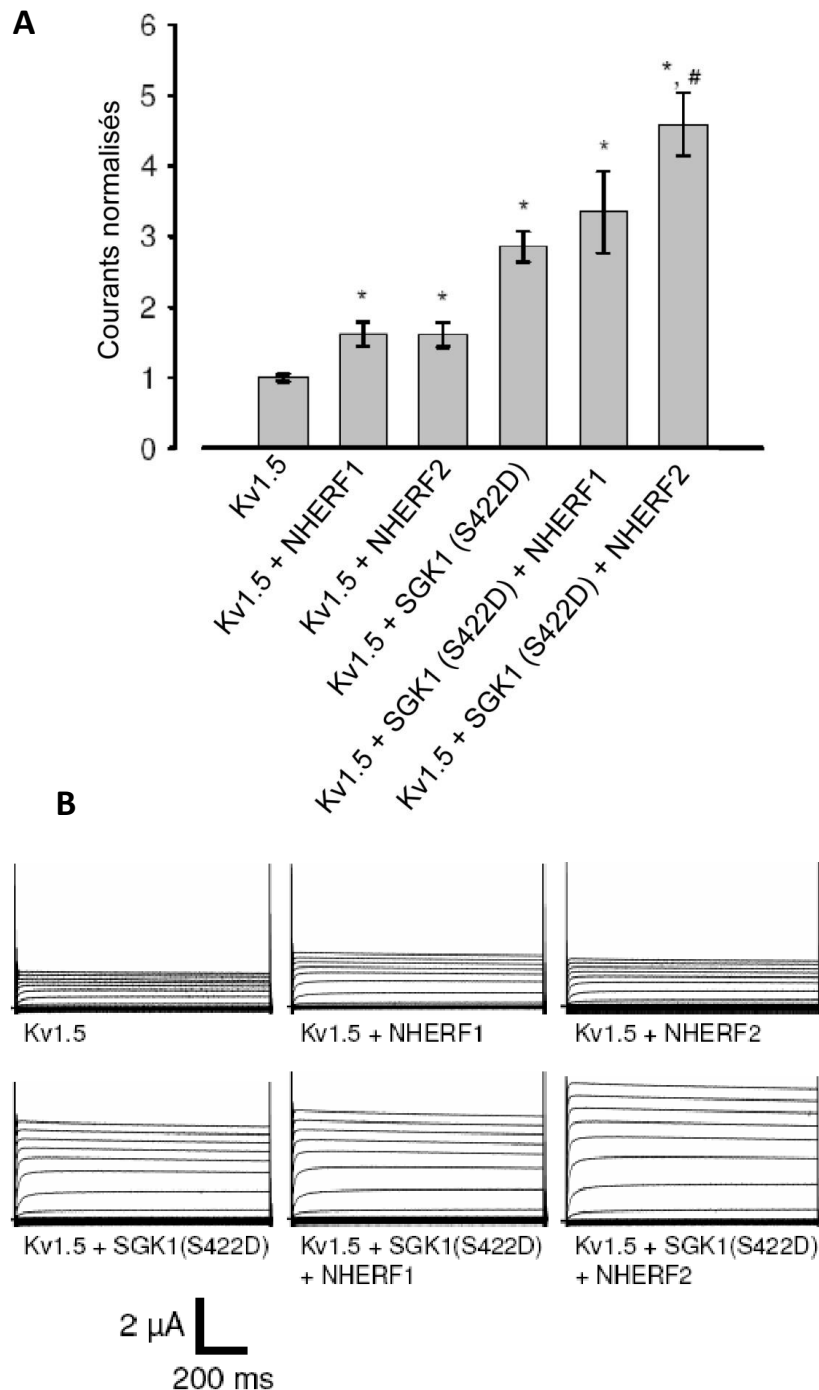
Des cellules COS ont été transfectées avec les ADN codants pour PSD-95 seul (a),  $Kv_{1.4}$  seul (b), ou PSD-95 et  $Kv_{1.4}$  (c). PSD-95 apparaît avec un marquage vert, sa distribution est diffuse lorsqu'il est présent seul dans les cellules. Le marquage de  $Kv_{1.4}$ , en rouge, est concentré dans une zone périnucléaire et dans le réticulum lorsqu'il est présent seul. Lorsque PSD-95 et  $Kv_{1.4}$  sont co-exprimés dans les cellules, leur distribution est modifiée, ils sont colocalisés dans les mêmes amas, ou "clusters" (modifiée d'après *Imamura et al.*, 2002).

entre différents canaux de la famille *Shaker* ( $Kv_{1.x}$ ) et la protéine à domaine PDZ PSD-95, grâce à une expérience de double-hybride réalisée chez la levure à partir de l'extrémité C-terminale du canal  $Kv_{1.4}$  (Kim *et al.*, 1995). L'association de PSD-95 a donc lieu sur l'extrémité C-terminale du canal : les 11 derniers résidus sont suffisants et les quatre derniers sont essentiels à cette interaction. Ces quatre résidus, reconnus par les protéines à domaines PDZ, sont extrêmement bien conservés dans la famille des canaux *Shaker*, mais pas dans les autres familles de canaux à 6 segments transmembranaires, *Shal*, *Shaw* et *Shab*. Il n'a d'ailleurs jamais été clairement démontré d'interaction de ces derniers avec des protéines à domaine PDZ.

Une interaction entre des canaux  $Kv_1$  et des protéines à domaine PDZ telles que PSD-95 ou SAP-97 a été démontrée à de nombreuses reprises, dans différents systèmes ou organismes : mammifère, aplysie, drosophile... (Arnold and Clapham, 1999; Ruiz-Canada *et al.*, 2002; Reissner *et al.*, 2008). Cette interaction n'interfère pas avec l'association du canal à sa sous-unité  $\beta$ . Il a également été prouvé que le niveau d'expression des différents canaux *Shaker* dans une synapse influence sa croissance et sa plasticité (Zito *et al.*, 1997). De plus, on sait que ces canaux, très exprimés dans le système nerveux central participent à la transmission synaptique et à la libération de neurotransmetteurs, entre autres. Il est donc important qu'ils soient précisément localisés dans les domaines subcellulaires auxquels ils sont destinés. Cela est réalisé, du moins en partie, par les protéines à domaine PDZ, qui, en interagissant avec ces canaux, vont permettre leur présence et leur accumulation, dans la densité post-synaptique par exemple grâce à PSD-95.

La conséquence de l'interaction entre  $Kv_1$  et PSD-95 est un "clustering" de ces deux protéines à la membrane plasmique (Kim *et al.*, 1995). En effet, quand  $Kv_{1.4}$  est exprimé seul dans un système d'expression hétérologue, il est distribué de façon diffuse au niveau de la membrane plasmique alors que la localisation de PSD-95, seule, est diffuse et cytoplasmique. De façon surprenante, quand ces deux protéines sont présentes dans une même cellule, leur localisation est complètement modifiée, puisqu'elles forment des amas, ou "cluster" à la membrane plasmique (*Figure 40*). PSD-95 ne semble pas avoir de rôle dans l'adressage du canal proprement dit puisque la co-expression de PSD-95 avec un canal qui n'est pas exprimé à la membrane plasmique, comme  $Kv_{1.2}$ , ne permet pas d'en modifier la localisation. Par contre si la sous-unité  $Kv_{\beta 2}$  est également présente, elle entraîne  $Kv_{1.2}$  à la membrane plasmique. Dans ces conditions PSD-95 va provoquer les mêmes "cluster" de protéines dans la cellule que ceux précédemment décrits pour  $Kv_{1.4}$ . PSD-95 a plutôt un rôle d'ancrage et de rétention de la protéine à laquelle elle se lie au niveau de domaines particuliers de la cellule, dans les systèmes d'expression hétérologue, comme dans les neurones, où elle va retenir les canaux dans la densité post-synaptique.





**Figure 41 : SGK1 et NHERF2 fonctionnent en synergie pour augmenter les courants  $Kv_{1.5}$  dans les ovocytes de xénope.**

La kinase SGK1 (S422D) est la forme constitutivement active de l'enzyme.

A. Courants normalisés enregistrés dans des ovocytes de xénope exprimant les différentes protéines.

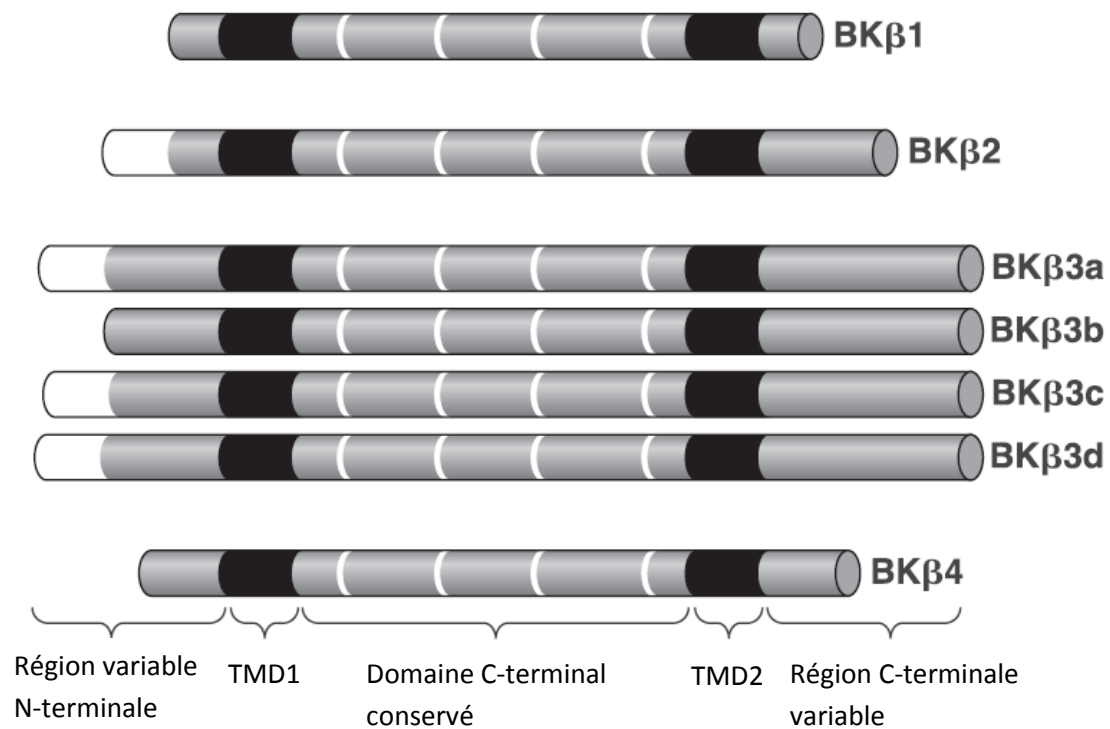
B. Enregistrements représentatifs des différentes conditions réalisés sur des ovocytes de xénope (modifiée d'après *Laufer et al.*, 2009).

Les canaux  $Kv_1$  sont également capables d'interagir avec une autre protéine à domaine PDZ, la protéine SAP-97 qui est exprimée dans les axones, au niveau pré-synaptique (Tiffany *et al.*, 2000). SAP-97 n'a pas du tout le même effet que PSD-95 sur les canaux auxquels elle se lie, puisque dans les systèmes d'expression hétérologue, elle entraîne leur rétention dans le réticulum endoplasmique. Malgré la très forte homologie entre PSD-95 et SAP-97 (73%), elles ne possèdent probablement pas les mêmes signaux d'adressage et d'ancrage. Le rôle de ces deux protéines à domaine PDZ est donc complètement différent, de même que leur localisation subcellulaire dans les neurones. L'une est dendritique et post-synaptique, PSD-95, tandis que l'autre est axonale et pré-synaptique. Un même canal pourra donc avoir plusieurs modes de fonctionnement en fonction de sa localisation subcellulaire.

PSD-95 n'est pas la seule protéine à domaine PDZ capable d'interagir avec les canaux  $Kv_1$ . La protéine NHERF ( $Na^+/K^+$  Exchanger Regulatory Factor), qui contient 2 domaines de liaison PDZ, est localisée à la membrane plasmique, et est impliquée dans l'adressage et la stabilisation de canaux ioniques ou de transporteurs. Il a été montré que NHERF-2 interagit avec le canal  $Kv_{1.5}$  (Laufer *et al.*, 2009). Cette interaction a pour conséquence d'augmenter l'expression membranaire du canal et donc d'augmenter les courants macroscopiques générés. Cet effet est dû à une modification de l'internalisation des canaux depuis la membrane vers les endosomes. Mais NHERF peut lier deux protéines, grâce à ses deux domaines de liaison PDZ : le canal et une autre protéine, telle que la kinase SGK-1 (Serum and Glucocorticoid Inducible Kinase 1), qui participe également à l'augmentation des courants  $Kv_{1.5}$ . NHERF-2 pourrait alors contribuer à la régulation de l'excitabilité électrique en contrôlant la quantité de canaux  $Kv_{1.5}$  à la surface, mais aussi en plaçant à proximité des molécules de signalisation telles que la protéine kinase SGK-1 (*Figure 41*).

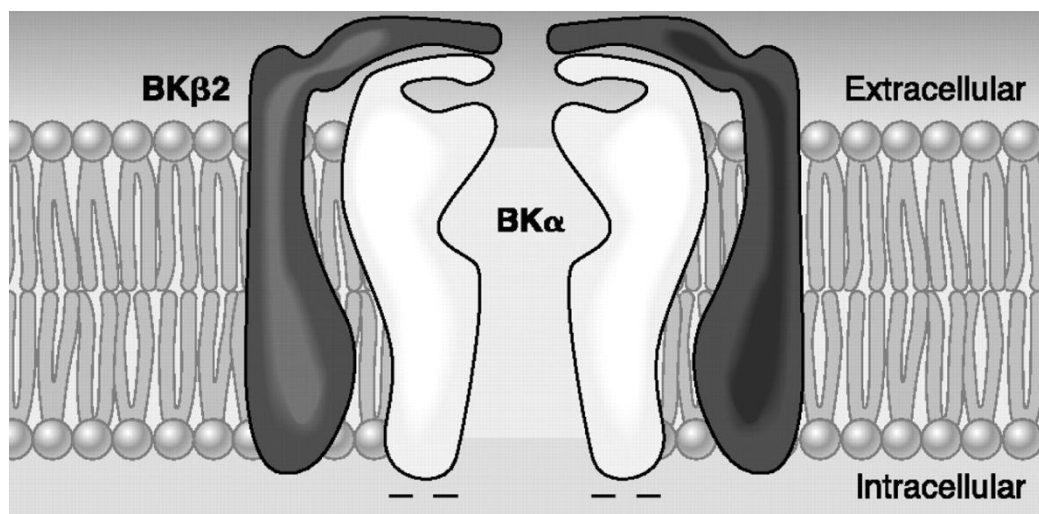
### II.1.3 Les sous-unités auxiliaires des canaux $BK_{Ca}$

Les canaux  $BK_{Ca}$  sont très largement exprimés dans les cellules excitables, notamment dans les neurones où le canal s'accumule dans les axones et les densités synaptiques (Misonou *et al.*, 2006), et dans les muscles lisses, où il joue un rôle important dans la régulation de la contraction musculaire (Petkov *et al.*, 2001). Ils sont également exprimés dans des cellules non-excitables, comme les cellules acineuses du pancréas exocrine où ils sont impliqués dans la régulation de la sécrétion (Petersen, 1992). L'absence de canaux  $BK_{Ca}$  ou l'expression de formes mutées sont associées à de nombreuses pathologies comme certaines formes d'hypertension, d'ataxie ou encore d'épilepsie. Ces canaux ont un mode de fonctionnement assez singulier puisque leur activité dépend d'une dépolarisation couplée à une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium. De plus, leur topologie est particulière, puisque contrairement à tous les autres canaux de cette famille, ils possèdent



**Figure 42 : Diversité des sous-unités  $BK_{Ca\beta}$  chez l'homme.**

TMD : domaine transmembranaire (modifiée d'après Pongs et al., 2010).



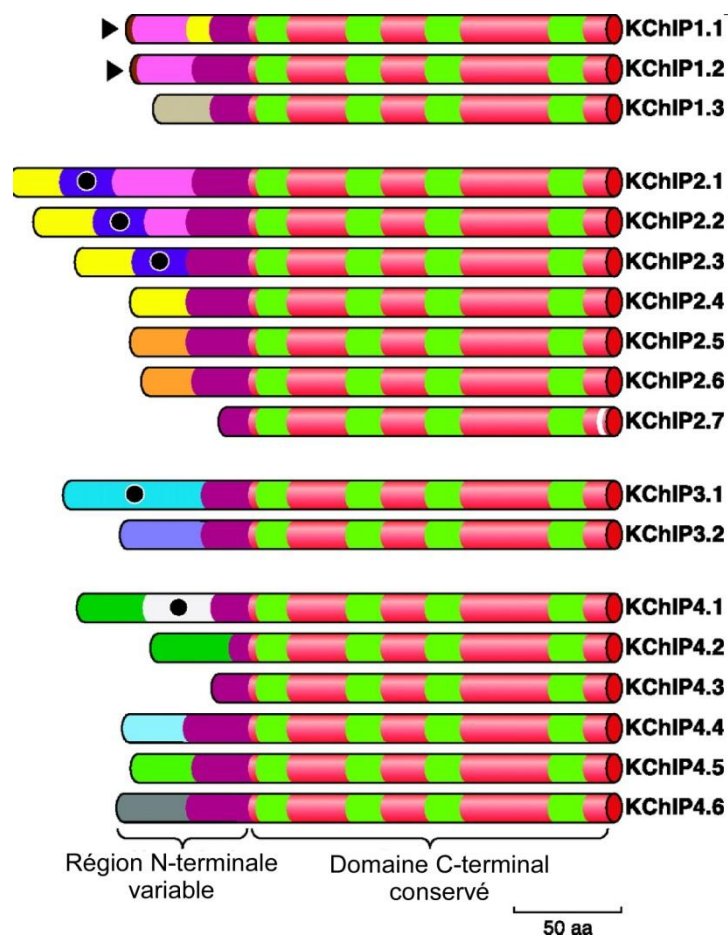
**Figure 43 : Représentation schématique d'un canal BK (gris clair) associé à sa sous-unité auxiliaire  $BK_{\beta 2}$  (gris foncé) (modifiée d'après Chen et al., 2008).**

sept segments transmembranaires. Un segment transmembranaire ( $S_0$ ) est ajouté à l'extrémité N-terminale (Toro *et al.*, 1998). Ces canaux ont donc leur extrémité C-terminale cytoplasmique et leur extrémité N-terminale extracellulaire. Cette particularité est importante pour la fixation d'une protéine membranaire, la sous-unité auxiliaire  $BK_{Ca\beta}$  (Lu *et al.*, 2006).

Les prédictions montrent que  $BK_{Ca\beta}$  possède deux segments transmembranaires, que ses deux extrémités sont intracellulaires, et qu'elle a une très grande boucle extracellulaire d'une centaine d'acides aminés, parmi lesquels se trouvent quatre sites de glycosylation et des résidus cystéine capables d'engendrer des ponts disulfures (Orio *et al.*, 2002). L'extrémité N-terminale de certaines isoformes  $BK_{Ca\beta}$  est relativement proche de l'extrémité des sous-unités  $Kv_\beta$ , et notamment de leur domaine d'inactivation. Les sous-unités  $BK_{Ca\beta}$  possèdent deux domaines connectés par un domaine flexible à leur extrémité N-terminale qui sont structurés de la même façon que les "balles" d'inactivation retrouvées chez certains canaux Kv et qui ont pour rôle de bloquer l'entrée du pore. Il existe quatre sous-unités  $BK_{Ca\beta}$  chez les mammifères (Figure 42). Chacune a un profil d'expression distinct, de même que les différentes isoformes  $BK_{Ca\alpha}$ , augmentant ainsi la diversité de courants. Les sous-unités auxiliaires  $BK_{Ca\beta}$ , comme cela est le cas pour les sous-unités  $Kv_\beta$ , sont capables de modifier les propriétés électrophysiologiques des canaux auxquels elles sont associées. L'extrémité N-terminale extracellulaire du canal interagit avec la boucle extracellulaire de  $BK_{Ca\beta}$ , et le domaine  $S_0$  s'associe quant à lui avec un ou deux domaines transmembranaires de la sous-unité auxiliaire (Torres *et al.*, 2007).

Chacune des sous-unités  $BK_{Ca\beta}$  a des effets différents sur les propriétés de "gating" du canal.  $BK_{Ca\beta 1}$  induit une plus grande sensibilité au calcium et une diminution de la dépendance au voltage (Bao and Cox, 2005) du canal auquel elle s'associe, et ceci grâce à une stabilisation du domaine senseur du voltage  $S_4$ . Les sous-unités  $BK_{Ca\beta 2}$  et  $BK_{Ca\beta 3}$  apportent une inactivation aux courants  $BK_{Ca}$  grâce à leur structure N-terminale en forme de balle d'inactivation capable de bloquer le pore du canal (Bentrop *et al.*, 2001). Enfin, la sous-unité  $BK_{Ca\beta 4}$  a un effet complexe sur la sensibilité du canal au calcium, mais est aussi capable de ralentir les cinétiques d'activation et de désactivation du canal (Ha *et al.*, 2004).

Les complexes de canaux  $BK_{Ca}$  immunoprécipités, à partir du cerveau notamment, sont composés de 8 sous-unités : quatre  $\alpha$  et quatre  $\beta$  (Figure 43) (Chen *et al.*, 2008). Cependant, la liaison de quatre sous-unités  $\beta$  sur le canal n'est pas obligatoire (Wang *et al.*, 2002). Outre les effets observés sur les propriétés biophysiques du canal, les sous-unités  $BK_{Ca\beta}$  peuvent aussi modifier leur pharmacologie. L'effet inhibiteur de deux toxines, la charybdotoxine et l'ibériotoxine, est altéré par la présence de la sous-unité auxiliaire sur le canal. Ces sous-unités auxiliaires semblent également, comme c'est le cas des sous-unités



**Figure 44 : Diversité des sous-unités KCHIP.**

Chaque gène produit de nombreux variants d'épissage qui ont un domaine C-terminal conservé et une région N-terminale variable. Les domaines d'interaction avec le calcium de type EF sont représentés en vert dans le domaine C-terminal. Les sites de myristoylation sont indiqués par un triangle noir et les sites de palmitoylation sont indiqués par un rond noir (modifié d'après *Burgoyne et al.*, 2007).

Kv $\beta$ , avoir un rôle dans l'adressage et la localisation des canaux qui leurs sont associés (pour revue (Torres *et al.*, 2007)).

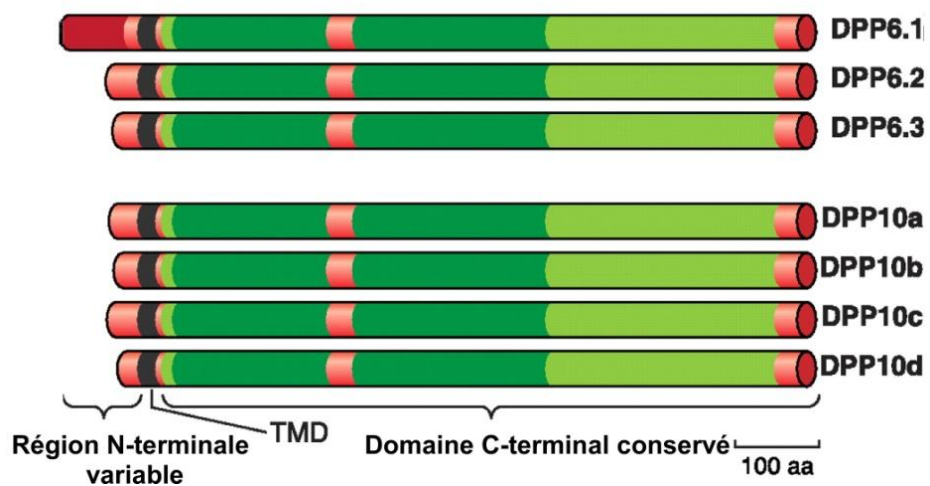
Les sous-unités BK $_{Ca\beta 1}$  sont notamment essentielles pour assurer une fonction normale des cellules vasculaires des muscles lisses. Les souris invalidées pour BK $_{Ca\beta 1}$  souffrent d'ailleurs d'hypertension liée à une constriction trop importante de ces vaisseaux (Brenner *et al.*, 2000). La sous-unité BK $_{Ca\beta 4}$  est la plus exprimée dans le cerveau. Les souris qui ne l'expriment pas ont une excitabilité neuronale trop importante, entraînant des crises d'épilepsie (Brenner *et al.*, 2005).

#### II.1.4 Les sous-unités KChIP et DPPL

Les protéines KChIP (K<sup>+</sup>-Channel Interacting Protein) ont été identifiées grâce à une expérience de double hybride chez la levure en utilisant l'extrémité N-terminale des canaux Kv $_{4.x}$  comme appât (An *et al.*, 2000). L'interaction entre ces deux protéines est spécifique et restreinte aux membres de la famille Kv $_{4.x}$ . Ces canaux sont responsables de deux courants natifs très bien identifiés, les courants neuronaux I $_A$  et les courants cardiaques I $_{to}$ . Les courants I $_A$  sont des courants potassiques à inactivation rapide qui présentent, en fonction des structures cérébrales, des cinétiques d'activation et d'inactivation ainsi qu'une dépendance au potentiel variable. Ces courants jouent un rôle important dans l'excitabilité neuronale, et notamment dans la propagation et la fréquence des potentiels d'action (voir §I.1.1.2). Les courants I $_{to}$  sont des courants transitoires responsables de la première phase de repolarisation qui suit le déclenchement d'un potentiel d'action cardiaque dans le ventricule (Pourrier *et al.*, 2003). Cependant, les courants générés par les canaux de la famille Kv $_{4.x}$  dans les systèmes d'expression hétérologue ne correspondent pas exactement aux courants enregistrés dans les systèmes natifs. L'identification de la sous-unité partenaire à ces canaux KChIP a permis de mieux comprendre cette différence.

Quatre gènes codant pour une sous-unité KChIP ont été identifiés chez les mammifères (KChIP $_{1-4}$ ) mais chacun de ces gènes génère de nombreux variants d'épissage. L'extrémité C-terminale ( $\approx$  180 acides aminés) est très bien conservée dans toutes les isoformes alors que l'extrémité N-terminale est beaucoup plus variable. Les sous-unités KChIP ont une taille de 200 à 250 acides aminés, elles sont cytosoliques et possèdent dans leur partie C-terminale quatre domaines de fixation au calcium de type "EF hand" (Figure 44) (Burgoyne, 2007).

Des expériences de microscopie électronique ont montré que les complexes Kv $_{4.x}$ /KChIP sont des octomères composés de quatre sous-unités  $\alpha$  et quatre sous-unités KChIP (Maffie and Rudy, 2008). Leur interaction est complexe et fait intervenir deux



**Figure 45 : Diversité des sous-unités DPPL.**

Les sous-unités DPP6 et DPP10 sont les seules de cette grande famille capables d'interagir avec les canaux  $Kv_{4.x}$ . Elles produisent plusieurs variants d'épissage, qui possèdent un segment transmembranaire (TMD, en noir) (modifiée d'après *Pongs et al.*, 2010).

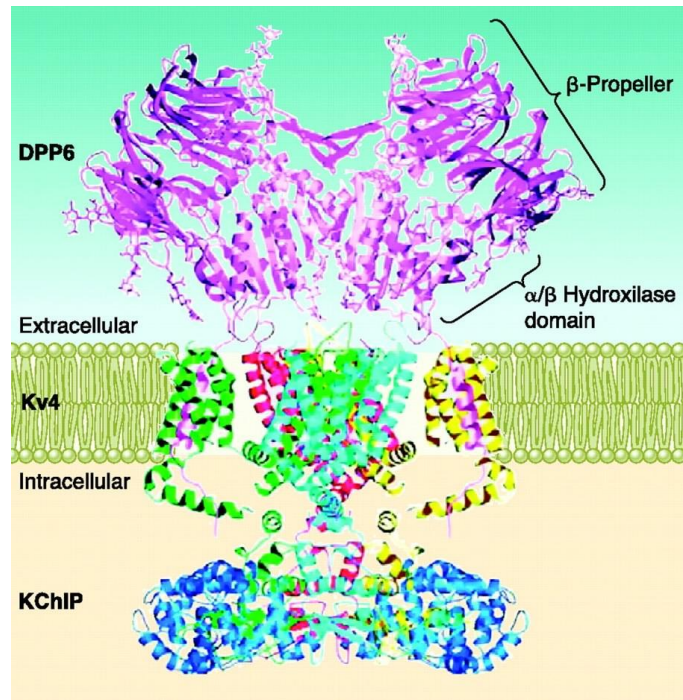
domaines distincts, situés au niveau de l'extrémité N-terminale de Kv<sub>4,x</sub>, qui interagissent avec une poche hydrophobe de KChIP. Quatre sous-unités KChIP entourent la face interne du tétramère Kv<sub>4,x</sub>, et chacune est capable de lier deux sous-unités Kv<sub>4,x</sub> adjacentes. Cela permet de maintenir ensemble deux sous-unités Kv<sub>4,x</sub> et stabiliser ainsi l'octomère (Figure 45).

Les rôles de KChIP sur les courants générés par les courants Kv<sub>4,x</sub> sont différents en fonction des isoformes. Le premier effet observé est une augmentation de la densité de courants Kv<sub>4,x</sub> lorsque KChIP est présente, qui est due à une augmentation du nombre de canaux présents à la membrane plasmique (An *et al.*, 2000; Shibata *et al.*, 2003). Cet effet n'est toutefois jamais observé avec les isoformes issues du gène KChIP<sub>4</sub>. KChIP facilite l'assemblage du canal dans le réticulum endoplasmique et favorise son insertion dans la membrane. Toutes les isoformes de KChIP, excepté KChIP<sub>4</sub>, possèdent au niveau de leur extrémité N-terminale des sites consensus de myristoylation et de palmitoylation. Ces deux modifications sont connues pour être impliquées dans la localisation membranaire d'autres protéines, ce qui semble également le cas ici. Le second rôle de KChIP sur Kv<sub>4,x</sub> est de moduler les propriétés biophysiques du canal (An *et al.*, 2000; Holmqvist *et al.*, 2002). Les canaux Kv<sub>4,x</sub> présentent une inactivation rapide et dépendant du potentiel. Les différentes isoformes de KChIP sont capables d'affecter ces propriétés, en modifiant les cinétiques d'inactivation et la dépendance au potentiel de cette inactivation. Par exemple, KChIP<sub>2</sub> ralentit d'environ sept fois la cinétique d'inactivation du canal, et accélère la récupération du canal, c'est-à-dire qu'il sera plus rapidement possible de l'activer de nouveau. Au contraire, KChIP<sub>1</sub> accélère l'inactivation des canaux Kv<sub>4,1</sub>, et déplace leur courbe d'inactivation vers des potentiels plus négatifs. La sous-unité KChIP<sub>4</sub> a un rôle particulier sur les propriétés électrophysiologiques du canal, puisqu'elle supprime l'inactivation rapide du courant de type A, et le transforme en un courant sortant très faiblement inactivé.

Les sous-unités KChIP sont donc capables de moduler les propriétés des canaux Kv<sub>4,x</sub> de différentes façons, en fonction de la composition des octomères. Cependant, les courants natifs de type A restent différents des courants enregistrés dans des cellules exprimant Kv<sub>4,x</sub> et KChIP (Maffie and Rudy, 2008). Cela a soulevé l'éventualité qu'une autre protéine pourrait être associée à ce complexe dans les systèmes natifs. L'immunoprécipitation de complexes Kv<sub>4,x</sub> natifs a permis de précipiter des complexes formés de trois protéines différentes : Kv<sub>4,x</sub>, KChIP et une troisième protéine ayant une taille de 115 kDa.

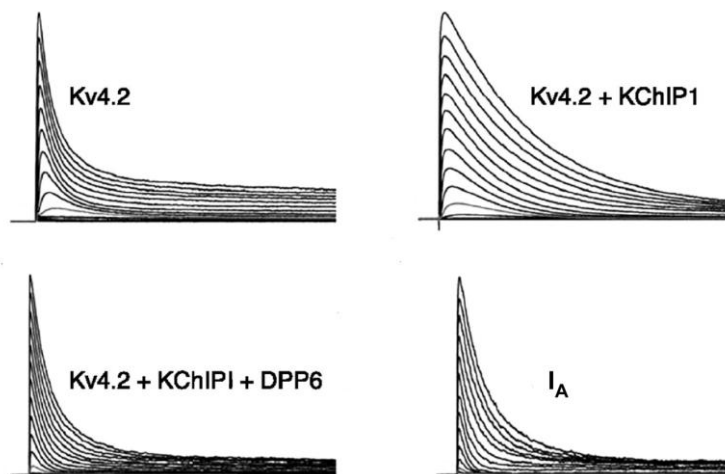
Cette nouvelle protéine appartient à la famille des DPP (Dipeptidyl aminoPeptidase Protein), qui sont des protéines membranaires avec une activité de protéase (Maffie *et al.*, 2009) (Nadal *et al.*, 2003). Elles sont codées par différents gènes, et les seules isoformes capables d'interagir avec les canaux Kv<sub>4,x</sub> sont les sous-unités DPP<sub>6</sub> et DPP<sub>10</sub>, qui elles-mêmes





**Figure 46 : Structure du complexe canal Kv<sub>4.3</sub>-KChIP<sub>1</sub>-DPP<sub>6</sub>.**

Les quatre sous-unités Kv<sub>4.3</sub> sont représentées de différentes couleurs. Deux sous-unités DPP<sub>6</sub> sont représentées ici en rose. Chacune possède un site catalytique et une structure en feuillets β. Elles interagissent avec un segment transmembranaire de la sous-unité canal. Les sous-unités KChIP intracellulaires sont représentées en bleu (modifiée d'après Maffie *et al.*, 2008).



**Figure 47 : Influence des sous-unités auxiliaires sur les propriétés du canal Kv<sub>4</sub>.**

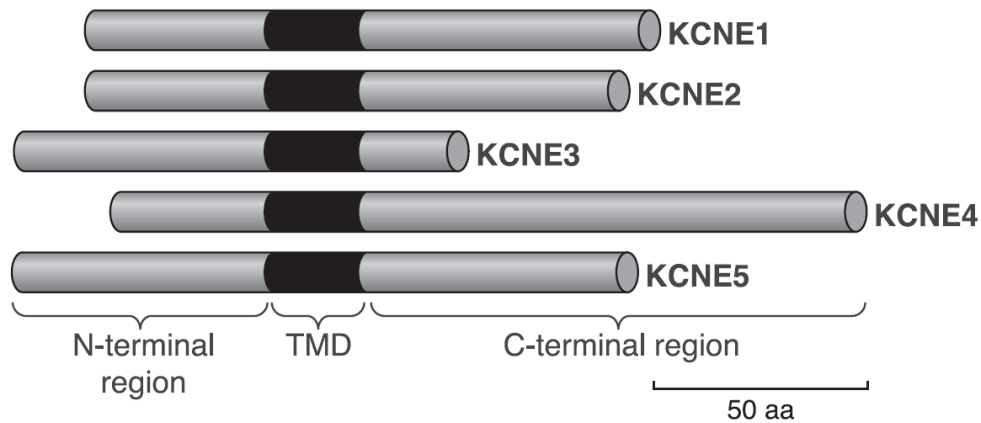
Courants enregistrés dans des cellules HEK293, transfectées avec les ADN de Kv<sub>4.2</sub> ; Kv<sub>4.2</sub> et KChIP<sub>1</sub> ou Kv<sub>4.2</sub>, KChIP<sub>1</sub> et DPP<sub>6</sub>, en réponse à une dépolarisation de -90 à +60 mV par incréments de 10 mV. Le potentiel de repos est -90 mV. Pour comparaison, des courants I<sub>A</sub> ont été enregistrés dans les neurones granulaires du cervelet. Les courants enregistrés dans des cellules exprimant Kv<sub>4</sub>, KChIP<sub>1</sub> et DPP<sub>6</sub> sont les plus ressemblants aux courants I<sub>A</sub> (modifiée d'après Maffie *et al.*, 2008).

possèdent plusieurs variants d'épissage (*Figure 46*). Contrairement aux autres membres de cette famille, les sous-unités qui interagissent avec les canaux  $Kv_{4,x}$  ne possèdent pas d'activité enzymatique. C'est pour cette raison qu'elles ont été désignées par l'acronyme DPPL (Dipeptidyl aminopeptidase Protein Like).

Les protéines DPPL possèdent une extrémité N-terminale cytoplasmique très courte, un segment transmembranaire et une très grande extrémité C-terminale extracellulaire, qui présente un site de glycosylation, un domaine riche en cystéine, et l'éventuel site catalytique. Le domaine C-terminal interagit avec des protéines de la matrice extracellulaire, stabilisant les complexes à la surface et contribuant ainsi à une augmentation de l'expression des canaux à la membrane plasmique (Strop *et al.*, 2004). Le segment transmembranaire de DPPL se lie au segment  $S_4$  senseur de voltage du canal, ce qui explique les effets de la liaison de DPPL sur la dépendance au voltage du canal (Ren *et al.*, 2005). La stœchiométrie du complexe n'est pas très bien connue, mais il semble que quatre sous-unités DPPL puissent interagir avec un tétramère. Outre le rôle de DPPL sur l'expression du canal à la membrane plasmique (Nadal *et al.*, 2003), l'association de cette sous-unité modifie les propriétés biophysiques du canal et provoque notamment une nette accélération de ses cinétiques d'activation, d'inactivation et de récupération après inactivation (Jerng *et al.*, 2007). De plus, DPPL modifie la dépendance du canal vis-à-vis du potentiel de membrane, en déplaçant ses seuils d'activation et d'inactivation vers des potentiels plus négatifs.

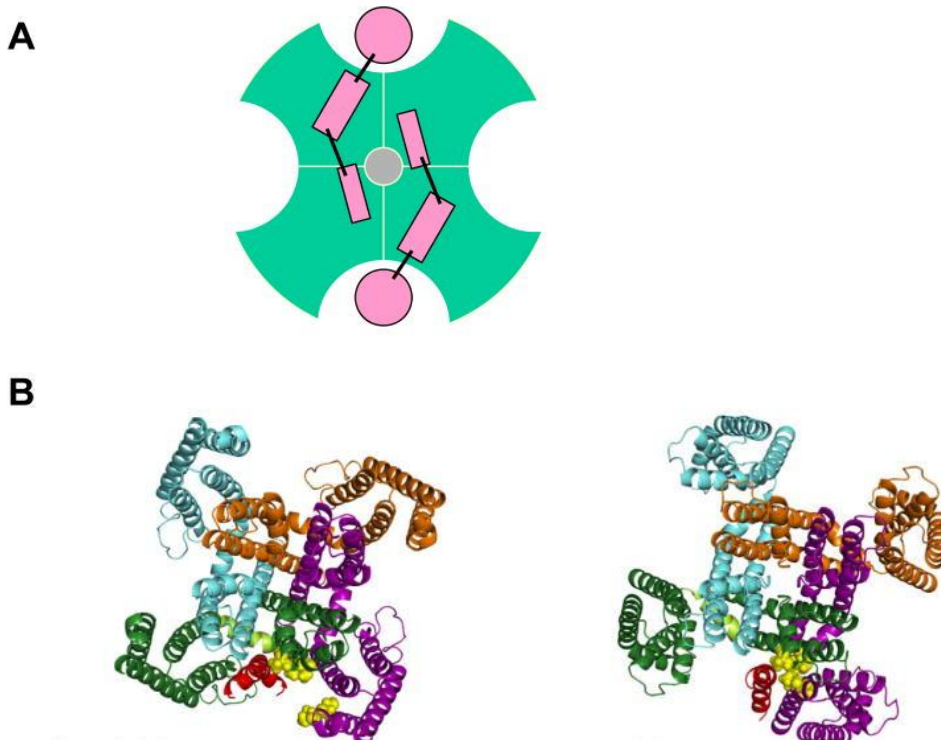
La co-expression dans un système d'expression hétérologue de  $Kv_{4,x}$ , KChIP et DPPL permet de générer un courant identique au courant neuronal de type A (Amarillo *et al.*, 2008) (*Figure 47*). La présence d'un tel complexe a été démontrée *in vivo* et les sous-unités KChIP et DPPL sont nécessaires à un adressage efficace du canal à la membrane plasmique, mais peut-être aussi à la localisation de celui-ci dans certains compartiments neuronaux spécifiques. Les deux sous-unités partenaires régulent également les propriétés biophysiques du canal, et par conséquent leur réponse aux neurotransmetteurs. Les différentes isoformes de chacune des trois protéines présentes dans ce complexe (12 protéines au total) favorisent une incroyable diversité de courants potassiques grâce à leur distribution tissulaire distincte et leurs effets sensiblement différents.

La composition exacte des complexes dans les différentes structures n'est pas connue, mais on peut imaginer qu'elle est finement régulée. En effet, la modification de la composition de ces complexes peut engendrer de fortes modulations des courants  $I_A$  et  $I_{t0}$ . Cela pourrait également expliquer les petites différences observées entre différents courants neuronaux  $I_A$ , en fonction de la localisation subcellulaire, mais aussi de la structure étudiée (Jerng *et al.*, 2004).



**Figure 48 : Diversité des sous-unités KCNE humaines.**

Elles sont codées par 5 gènes, et possèdent un domaine transmembranaire (TMD en noir) (d'après Pongs *et al.*, 2010).



**Figure 49 : Modèle structural du complexe Kv<sub>7.1</sub>-KCNE<sub>1</sub>.**

A. Représentation schématisée du complexe vu de haut depuis le milieu extracellulaire. Deux sous-unités KCNE<sub>1</sub> (en rose) se lient à 4 sous-unités canal (en vert), expliquant la stœchiométrie 2:4 décrite.

B. Structure du complexe Kv<sub>7.1</sub>-KCNE<sub>1</sub> dans l'état fermé à gauche et ouvert à droite. Chaque sous-unité  $\alpha$  est représentée d'une couleur différente (vert, violet, bleu et orange). Une seule sous-unité KCNE est représentée (rouge) (modifiée d'après Kang *et al.*, 2008).

### II.1.5 Les sous-unités KCNE

Le gène *KCNE1* ( $K^+$  voltage gated channel subfamily member E) a été identifié en 1988 à partir de rein de rats (Takumi *et al.*, 1988). Ce gène code pour une protéine à laquelle plusieurs noms ont été donnés : IsK, *KCNE<sub>1</sub>* ou encore MinK1 (Minimal  $K^+$  channel protein). On a longtemps cru que MinK était l'entité minimale capable de générer un canal potassique. En réalité *KCNE<sub>1</sub>* ne peut pas former un canal potassique seule, elle interagit avec d'autres canaux potassiques, principalement les canaux de la sous-famille  $Kv_{7.x}$  (*KCNQ*), pour lesquels elle joue le rôle de protéine auxiliaire, capable d'en modifier les propriétés biophysiques (Barhanin *et al.*, 1996; Sanguinetti *et al.*, 1996).

Il existe cinq gènes codant pour des protéines proches de MinK chez les mammifères : *KCNE<sub>1-5</sub>*, codant pour des protéines nommées *KCNE<sub>1-5</sub>* (Figure 48). La protéine *KCNE<sub>1</sub>* possède 50% d'identité avec *KCNE<sub>2</sub>* et seulement 35% avec *KCNE<sub>3</sub>* pourtant leur topologie est identique. Elles possèdent un seul segment transmembranaire de 23 acides aminés, qui est le domaine le mieux conservé parmi les différentes espèces. L'extrémité N-terminale est extracellulaire et contient deux sites de glycosylation et la région C-terminale intracellulaire présente un site de phosphorylation par la PKC (Abbott and Goldstein, 2001; McCrossan and Abbott, 2004). Ces sous-unités sont particulières, non seulement en raison de leur structure, mais aussi parce que chacune des protéines est codée par un gène indépendant, et aucun de ces gènes ne semble générer de variants d'épissages, contrairement aux autres sous-unités auxiliaires connues (Cai *et al.*, 2006).

Le domaine d'interaction des protéines *KCNE* avec les canaux  $Kv_{7.x}$  n'est pas connu précisément. Cependant, il a été démontré il y a peu de temps que la stœchiométrie de ce complexe est de 0.5 : 1, c'est-à-dire que deux sous-unités *KCNE* s'associent à un tétramère  $Kv_{7.x}$ . Une étude récente avance également l'hypothèse que *KCNE<sub>1</sub>* puisse interagir avec les résidus formant le pore du canal, à savoir les segments  $S_5$  et  $S_6$  ainsi que la boucle P. Le domaine transmembranaire de *KCNE<sub>1</sub>* serait placé dans une poche entre le segment  $S_4$ , senseur du voltage d'une sous-unité, et la boucle P de la sous-unité  $Kv_{7.x}$  adjacente. Une telle interaction entraîne une modification conformationnelle du canal très importante, ce qui, encore une fois distingue ces protéines des autres sous-unités auxiliaires connues (Kang *et al.*, 2008)(Figure 49).

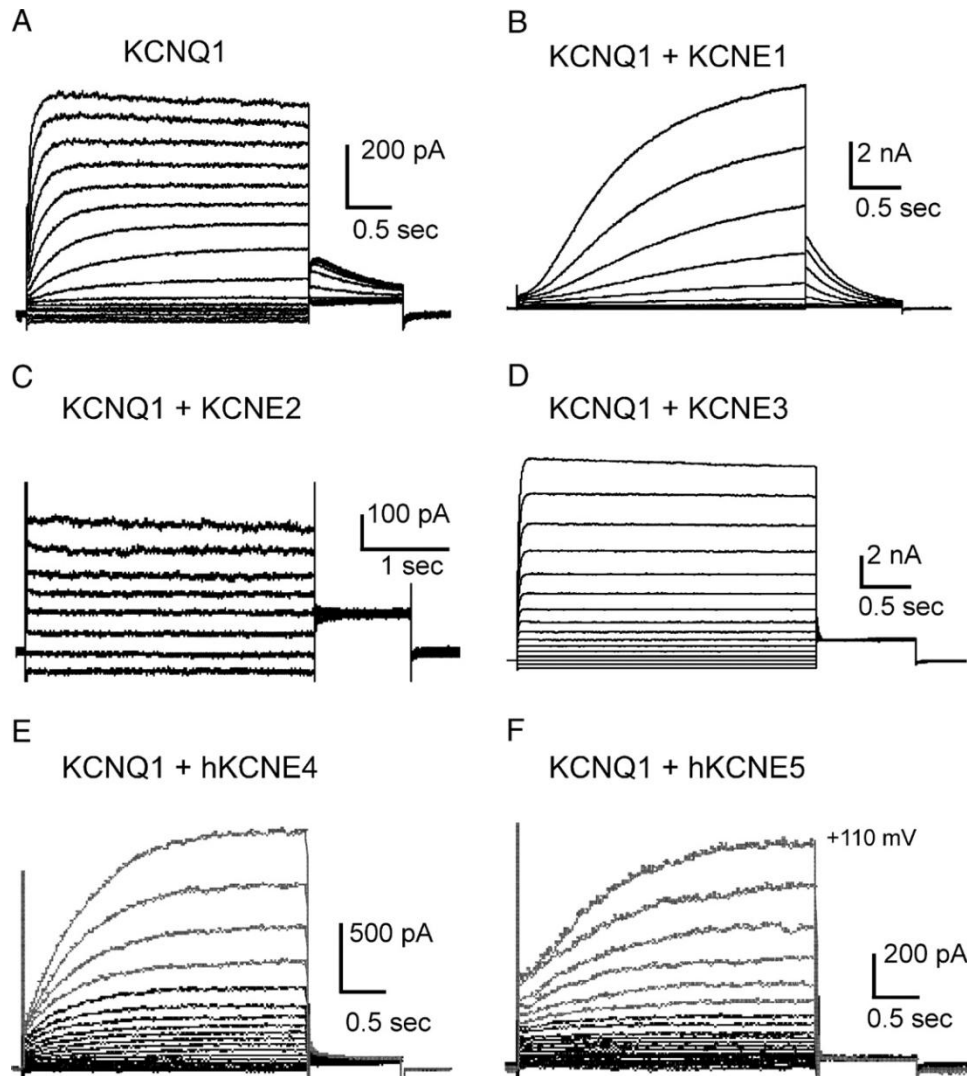
Le canal  $Kv_{7.1}$  (*KCNQ<sub>1</sub>*) a été initialement appelé *KvLQT<sub>1</sub>* en raison de son implication dans le syndrome du long QT (*LQT<sub>1</sub>*), une pathologie cardiaque. Ce canal génère dans les systèmes d'expression hétérologue un courant potassique totalement différent des courants cardiaques natifs. La présence de *KCNE<sub>1</sub>* est nécessaire pour qu'un courant similaire au courant natif  $I_{Ks}$  soit généré par  $Kv_{7.1}$  (Barhanin *et al.*, 1996). Celui-ci intervient dans la phase



tardive de repolarisation après le déclenchement d'un potentiel d'action cardiaque (Pourrier *et al.*, 2003). Le courant produit par Kv<sub>7.1</sub> et KCNE<sub>1</sub> dans les systèmes d'expression hétérologue n'est toutefois pas exactement identique au courant natif cardiaque I<sub>Ks</sub>. Pour cela, il faut co-exprimer la protéine yotiao, une protéine d'échafaudage capable de lier la PKA et l'extrémité C-terminale de Kv<sub>7.1</sub> (Marx *et al.*, 2002). Yotiao permet de rapprocher la protéine kinase A ainsi que la protéine phosphatase 1 de leur effecteur, le canal Kv<sub>7.1</sub>, permettant ainsi de contrôler le niveau de phosphorylation du canal. L'assemblage d'un tel complexe semble donc nécessaire pour reproduire toutes les facettes du courant I<sub>Ks</sub> (Kurokawa *et al.*, 2004).

La liaison de KCNE<sub>1</sub> sur Kv<sub>7.1</sub> a de nombreuses conséquences. L'association entre les deux protéines se réalise très tôt dans leur processus de maturation, et a pour effet de promouvoir le transport du canal Kv<sub>7.x</sub> vers la membrane plasmique, ce qui augmente la densité des courants générés. De plus l'association de KCNE<sub>1</sub> sur Kv<sub>7.1</sub> engendre une diminution du temps d'activation, un déplacement de la dépendance au voltage du canal de 20mV vers des potentiels plus dépolarisés, une suppression de l'inactivation et une augmentation de la conductance unitaire du canal (4 à 7 fois) (Barhanin *et al.*, 1996; Pusch, 1998). Enfin, la liaison de KCNE<sub>1</sub> modifie les propriétés pharmacologiques du canal Kv<sub>7.1</sub>, le complexe est alors moins sensible au bloqueur spécifique des canaux Kv<sub>7.x</sub> XE991 (Wang *et al.*, 2000) mais sa sensibilité est largement augmentée pour d'autres bloqueurs, tels que le chromanol 293B ou l'azimilide. Cette modification des propriétés pharmacologiques n'est pas spécifique à KCNE<sub>1</sub>, puisque l'association de KCNE<sub>2</sub> et KCNE<sub>3</sub> à Kv<sub>7.1</sub> entraîne également une sensibilité accrue au chromanol 293B.

Dans les systèmes d'expression hétérologues, Kv<sub>7.1</sub> est capable de s'associer avec toutes les sous-unités KCNE. Cependant toutes ne produisent pas les mêmes effets sur les propriétés biophysiques du canal. Ainsi, la liaison de KCNE<sub>3</sub> sur Kv<sub>7.1</sub> déstabilise l'état fermé du canal et le transforme en un canal insensible au potentiel (Schroeder *et al.*, 2000). Kv<sub>7.1</sub> se comporte alors comme un canal de fuite, ouvert au potentiel de repos, dont la conductance unitaire est multipliée par 10. Cet effet opposé des deux sous-unités est lié à un domaine de 3 acides aminés situé dans le segment transmembranaire. Sa permutation permet de transférer les propriétés de l'une des sous-unités à l'autre. La co-expression de KCNE<sub>4</sub> avec Kv<sub>7.1</sub> inhibe totalement les courants. En réalité, c'est la courbe de dépendance au voltage du canal qui est déplacée vers des potentiels très dépolarisés non physiologiques. Le même effet est observé avec KCNE<sub>5</sub> (Angelo *et al.*, 2002). En revanche, KCNE<sub>2</sub> produit des effets comparables à KCNE<sub>3</sub> sur le canal Kv<sub>7.1</sub>, en produisant un canal constitutivement actif (Bendahhou *et al.*, 2005). D'autres canaux de cette sous-famille interagissent avec les sous-unités KCNE. C'est le cas des canaux Kv<sub>7.2</sub> et Kv<sub>7.3</sub>, qui s'organisent en hétéromultimères pour



**Figure 50 : Modification des courants KCNQ<sub>1</sub> par les différentes sous-unités KCNE<sub>1</sub>.**

Enregistrements de patch clamp en configuration cellule entière de cellules COS transfectées avec des ADN codants pour KCNQ<sub>1</sub> seul (A) ou KCNQ<sub>1</sub> et chacune des 5 sous-unités KCNE (B-F). Les cellules sont maintenues à un potentiel de repos de -80 mV et les courants sont activés par une dépolarisation de -100 mV à +40 mV (B-D) ou +90 mV (E-F) par incréments de 10 mV (d'après Bendahhou *et al.*, 2005).

produire le courant potassique neuronal de type M (Levitan, 2006). La liaison de KCNE<sub>2</sub> à ce canal permet d'accélérer sa déactivation (*Figure 50*).

Les sous-unités KCNE, de même que les canaux KCNQ sont impliqués dans de nombreuses pathologies, cardiaques pour la plupart. Des mutations dans KCNE<sub>1</sub> ou Kv<sub>7.1</sub> sont par exemple associées à une arythmie cardiaque mortelle, le syndrome du long QT (Sanguinetti *et al.*, 1995). Cette arythmie est caractérisée par un allongement de la durée entre les ondes cardiaques Q et T, principalement du à une repolarisation retardée des cellules du ventricule à la suite d'un potentiel d'action. Cela conduit à des phénomènes de torsades de pointes, une fibrillation ventriculaire et parfois une mort subite. A l'heure actuelle, il est très difficile d'envisager une action thérapeutique sur ces canaux, que ce soit les sous-unités  $\alpha$  ou  $\beta$ , car on ne connaît pas encore la distribution cellulaire précise de ces différentes sous-unités dans les autres structures du cœur, où elles pourraient avoir un rôle essentiel.

L'étude des implications cardiaques de KCNE et Kv<sub>7.1</sub> n'est pas aisée car, contrairement à la majorité des cas, il est difficile d'extrapoler les résultats obtenus à partir des souris invalidées pour ces gènes. La fonction cardiaque des souris est très différente de celle de l'homme, en particulier parce que le rythme cardiaque est 10 fois supérieur à celui de l'homme, mais aussi parce que les composants moléculaires sont différents entre les deux espèces. Malgré cela, de nombreuses études ont été menées sur ces animaux, avec des résultats contradictoires. Il semble cependant que les souris KCNE<sub>1</sub><sup>-/-</sup> ne soient pas capables de s'adapter correctement à des changements de leur rythme cardiaque.

Ces sous-unités ne sont pas exprimées uniquement dans le cœur. Kv<sub>7.1</sub> est également présent dans l'épithélium gastro-intestinal, le rein ou encore l'oreille interne, où il joue un rôle important dans le transport des sels et la régulation des fluides. Dans ces tissus, Kv<sub>7.1</sub> peut s'assembler avec KCNE<sub>1</sub> et KCNE<sub>2</sub> qui sont également présentes. De façon cohérente, les souris KCNE<sub>1</sub><sup>-/-</sup> et KCNE<sub>2</sub><sup>-/-</sup> présentent une grande variété de symptômes. Les souris KCNE<sub>1</sub><sup>-/-</sup> sont sourdes (Vetter *et al.*, 1996) et présentent un comportement de type *Shaker/Waltzer* (balancement et dodelinement de la tête, ataxie, instabilité...) caractéristique d'un problème vestibulaire au niveau de l'oreille interne. L'absence de cette sous-unité a des conséquences importantes sur le transport des ions et la régulation des fluides à travers les épithéliums, conduisant à la destruction des cellules ciliées et à des malformations de la cochlée et du vestibule. Ces souris présentent aussi des problèmes rénaux et gastro-intestinaux, dus également à une mauvaise régulation des fluides et un transport défaillant des sels de part et d'autre des épithéliums (Warth and Barhanin, 2002). En ce qui concerne la sous-unité KCNE<sub>2</sub>, son absence modifie la localisation du canal Kv<sub>7.1</sub> dans les cellules des glandes gastriques conduisant à une diminution de la sécrétion de





protons dans l'estomac (Roepke *et al.*, 2006). Récemment une étude a montré que les souris  $KCNE_2^{-/-}$  souffrent également d'une hypothyroïdie sévère (Roepke *et al.*, 2009). Le canal  $Kv_{7.1}$  associé à  $KCNE_2$  joue un rôle primordial dans la synthèse des hormones thyroïdiennes  $T_3$  et  $T_4$  (Tri- et tétraïodothyronine). Les souris  $KCNE_2^{-/-}$  présentent des concentrations en ces hormones 8 fois inférieures à la moyenne, ce qui a de graves conséquences, notamment une hypertrophie cardiaque, une alopecie et un nanisme. Un phénotype normal est rétabli chez ces souris si les hormones  $T_3$  et  $T_4$  sont administrées aux nouveau-nés.

L'interaction des sous-unités KCNE n'est pas spécifique à la famille des canaux  $Kv_{7.x}$ .  $KCNE_1$  et  $KCNE_2$  s'associent dans des systèmes d'expression hétérologue au canal  $Kv_{11.1}$  également nommé HERG (Human ether-à-go-go-related gene) (Trudeau *et al.*, 1995) responsable du courant cardiaque  $I_{Kr}$ , un courant potassique participant à la première phase de repolarisation suivant le déclenchement d'un potentiel d'action cardiaque (Sanguinetti *et al.*, 1995). La co-expression de  $KCNE_1$  avec HERG conduit à une petite augmentation des courants et une modification des propriétés biophysiques, notamment un déplacement de la dépendance au potentiel vers des valeurs plus négatives.  $KCNE_2$  interagit également avec HERG *in vitro*. *In vivo*, des mutations dans la séquence de  $KCNE_2$  sont responsables de modifications du courant  $I_{Kr}$  (McDonald *et al.*, 1997). La plupart des mutations identifiées sur  $KCNE_2$  provoquent une diminution de l'amplitude d' $I_{Kr}$ , et donc une repolarisation moins efficace à la suite d'un potentiel d'action, ce qui peut aboutir à des torsades de pointes ou un déclenchement anarchique de potentiels d'actions.

Les canaux  $Kv_{4.2}$  et  $Kv_{4.3}$  sont également capables d'interagir *in vitro* avec  $KCNE_2$  (Abbott *et al.*, 2001) (Zhang *et al.*, 2001). Cette interaction n'a jamais été démontrée *in vivo*, mais dans les systèmes d'expression hétérologue  $KCNE_2$  modifie la densité de courants et les propriétés biophysiques de ces canaux. De la même façon,  $KCNE_1$ ,  $KCNE_2$  et  $KCNE_3$  modulent les canaux  $Kv_{3.1}$  et  $Kv_{3.2}$  en ralentissant leur activation et désactivation, et en accélérant leur cinétique d'inactivation (Lewis *et al.*, 2004).

L'ensemble des résultats obtenus indique clairement que la famille KCNE est importante d'un point de vue physiologique. Ses différents membres peuvent interagir avec plusieurs types de canaux potassiques, de sous-familles différentes, et modifier leurs caractéristiques biophysiques. Cette importance est également démontrée par l'existence de pathologies directement liées à des mutations sur ces protéines.



### II.1.6 Les sous-unités silencieuses ou modulatrices

La recherche d'homologues des canaux potassiques à 6 domaines transmembranaires dépendant du voltage a permis le clonage de nombreuses sous-unités  $\alpha$ . Certaines d'entre elles ne possèdent pas d'activité canal intrinsèque lorsqu'elles sont exprimées dans un système d'expression hétérologue. Pour cette raison, elles ont dans un premier temps été décrites comme silencieuses. C'est le cas des sous-unités Kv<sub>5.1</sub>, Kv<sub>6.1</sub>, Kv<sub>6.2</sub>, Kv<sub>6.3</sub>, Kv<sub>6.4</sub>, Kv<sub>8.1</sub>, Kv<sub>8.2</sub>, Kv<sub>9.1</sub>, Kv<sub>9.2</sub> et Kv<sub>9.3</sub>. Peu après leur découverte, il a été montré qu'elles sont certes silencieuses, mais tout de même fonctionnelles. Elles sont en effet capables de former des hétérotétramères de stœchiométrie variable avec les canaux de la famille Kv<sub>2.x</sub> (KCNB ou *Shab*). Les canaux ainsi formés possèdent de nouvelles propriétés électrophysiologiques.

La sous-unité Kv<sub>8.1</sub> est incapable de générer un courant quand elle est exprimée seule parce qu'elle est retenue dans un compartiment intracellulaire. Elle est cependant capable de former des hétérotétramères avec les canaux Kv<sub>2.x</sub> qui lui permettent alors d'atteindre la membrane plasmique. Lorsqu'elle est présente à faible concentration avec Kv<sub>2.x</sub>, elle en modifie les propriétés biophysiques, en particulier en ralentissant leurs cinétiques d'activation et d'inactivation, alors qu'à forte concentration Kv<sub>8.1</sub> inhibe complètement l'expression des deux sous-unités  $\alpha$ , Kv<sub>2.1</sub> et Kv<sub>2.2</sub>. C'est le segment S<sub>6</sub> de la sous-unité Kv<sub>8.1</sub> qui contient les éléments nécessaires à la modification des cinétiques d'activation des canaux Kv<sub>2.x</sub> (Salinas *et al.*, 1997).

La sous-unité Kv<sub>9.1</sub> est également capable de moduler les canaux Kv<sub>2.x</sub> et notamment leurs cinétiques d'activation et d'inactivation, mais également leur dépendance au voltage. La sensibilité à certains agents pharmacologiques, comme le TEA est modifiée quand la sous-unité Kv<sub>9.1</sub> est présente. L'association de Kv<sub>9.1</sub> pourrait modifier la propagation des potentiels d'action dans les cellules excitables (Salinas *et al.*, 1997).

Ces sous-unités silencieuses sont donc capables de moduler le niveau d'expression d'autres sous-unités  $\alpha$ , mais aussi de modifier leurs propriétés biophysiques (Richardson and Kaczmarek, 2000) (Patel *et al.*, 1997) (Ottschytch *et al.*, 2002) (Kramer *et al.*, 1998). Un tel processus peut apporter un niveau de régulation supplémentaire à toute une famille de canaux, engendrant ainsi une très grande diversité de courants potassiques, qui peuvent être exprimés dans des domaines subcellulaires particuliers. De ce fait, de silencieuses, ces sous-unités sont devenues modulatrices.



## II.1.7 Autres protéines associées

### a. Lgi1

Un courant de type A, qui module la transmission synaptique est enregistré dans les terminaisons axonales de l'hippocampe. Les canaux à l'origine de ce courant sont des hétérotétramères composés des sous-unités  $Kv_{1.1}$ ,  $Kv_{1.4}$  et  $Kv_{\beta 1}$ . Dans le cerveau, ces complexes sont retrouvés associés à une autre protéine, Lgi1 (Leucine rich Glioma Inactivated gene) (Schulte *et al.*, 2006). Celle-ci possède dans sa structure de nombreux domaines riches en leucine, impliqués dans l'interaction avec d'autres protéines. La fonction de Lgi1 est encore très mal connue, mais elle semble jouer un rôle de suppresseur de tumeurs car elle est réprimée dans les gliomes malins, et elle empêche la prolifération de lignées cellulaires.

Son interaction avec les canaux  $Kv_{1.1}$  empêche l'inactivation de type N, normalement assurée par la sous-unité  $Kv_{\beta 1}$ . Un tel effet n'est pas observé avec les autres canaux de cette sous-famille. L'interaction de Lgi1 sur  $Kv_{1.1}$  est donc spécifique.

Une mutation de Lgi1, qui n'est alors plus capable d'inhiber l'inactivation de type N de  $Kv_{1.1}$ , est associée à une forme d'épilepsie : l'épilepsie autosomale dominante du lobe temporal latéral (ADLTE) caractérisée par des crises partielles accompagnées d'hallucinations sensorielles. L'association normale de Lgi1 avec les canaux présynaptiques  $Kv_{1.1}$  inhibe l'inactivation de type N de ces derniers, ce qui maintient la sortie des ions  $K^+$  pendant une longue durée. Cela induit une hyperpolarisation de la cellule, et donc une diminution de l'excitabilité membranaire. Lorsque Lgi1 est mutée, l'inactivation de type N s'installe rapidement après l'activation de ces courants, mettant ainsi un terme au mouvement d'ions et provoquant une augmentation de l'excitabilité cellulaire qui aboutit à de telles crises d'épilepsie (Schulte *et al.*, 2006).

### b. La calmoduline

Bien que ne possédant aucune structure ou séquence consensus de fixation du calcium, les canaux potassiques de la famille  $K_{Ca}$  (KCNN) sont activés par une élévation de la concentration de calcium intracellulaire. Ces canaux, présents dans les cellules excitables mais également dans les cellules non-excitables, jouent un rôle crucial dans la régulation de l'excitabilité membranaire (voir §I.1.1.3).

Leur sensibilité au calcium est apportée par la fixation d'une protéine cytosoluble, la calmoduline, qui se fixe au niveau de l'extrémité C-terminale du canal, immédiatement après



le segment S<sub>6</sub>. Cette association est constitutive et ne nécessite pas la présence de calcium, puisque des mutants de calmoduline insensibles au calcium s'associent tout de même au canal (Fanger *et al.*, 1999) (Xia *et al.*, 1998).

La calmoduline possède quatre sites de fixation du calcium de type "EF Hand" distribués équitablement sur deux domaines, appelés lobes N et C (Schumacher *et al.*, 2001). L'occupation des sites du lobe N est essentielle pour l'ouverture du canal. En absence de calcium, la calmoduline se fixe sous forme monomérique, elle ne se dimérise qu'après fixation de l'ion sur les sites des lobes N. Cette dimérisation conduit à un changement conformationnel qui, transmit aux domaines S<sub>6</sub> des sous-unités  $\alpha$ , provoque l'ouverture du canal.

La calmoduline est également partenaire de canaux appartenant à la famille KCNQ (Kv<sub>7</sub>), qui s'associent à la calmoduline de façon constitutive. Cette interaction induit une inhibition calcium-dépendante des courants KCNQ<sub>2</sub>/KCNQ<sub>3</sub>. Cependant, même en absence de calcium, l'interaction de ces canaux avec la calmoduline semble importante pour la génération du courant de type M dans les systèmes d'expression hétérologue et les neurones (Levitan, 2006).

### c. Autres sous-unités associées

De nombreuses autres protéines sont capables d'interagir avec des sous-unités  $\alpha$ . Il existe une protéine à douze domaines transmembranaires, KCR1 (K<sup>+</sup> Channel Regulator), dont l'extrémité C-terminale interagit avec le canal *eag* (KCNH<sub>1</sub>) de rat. La co-expression de ces deux protéines provoque une accélération de la cinétique d'activation du courant (Hoshi *et al.*, 1998).

La protéine dSLIP (dSlo Interacting Protein) est capable de s'associer de façon spécifique aux canaux potassiques à 6 domaines transmembranaires de drosophile, dSlo (drosophila Slowpoke). dSLIP est une protéine cytosoluble qui induit une diminution des courants macroscopiques générés par le canal sans affecter les autres paramètres biophysiques tels que la conductance unitaire, la sensibilité au calcium ou encore la probabilité d'ouverture (Xia *et al.*, 1998).

Le canal de drosophile dSlo s'associe également à une famille de protéines, à laquelle appartient 14-3-3, qui sont des protéines cytosolubles et ubiquitaires, capables de se fixer et de moduler un grand nombre de protéines cellulaires, dont certains canaux ioniques. L'association entre 14-3-3 et dSlo n'est pas directe mais nécessite une troisième protéine, la sous-unité Slob, sous-unité auxiliaire spécifique du canal dSlo. L'association de Slob avec dSlo entraîne une augmentation de la probabilité d'ouverture du canal. La protéine 14-3-3, quand





elle se fixe à ce complexe par l'intermédiaire de Slob, a pour conséquence d'antagoniser les effets de Slob, en déplaçant le seuil d'activation du canal dSlo vers des valeurs plus dépolarisées du potentiel (Zhou *et al.*, 2003).

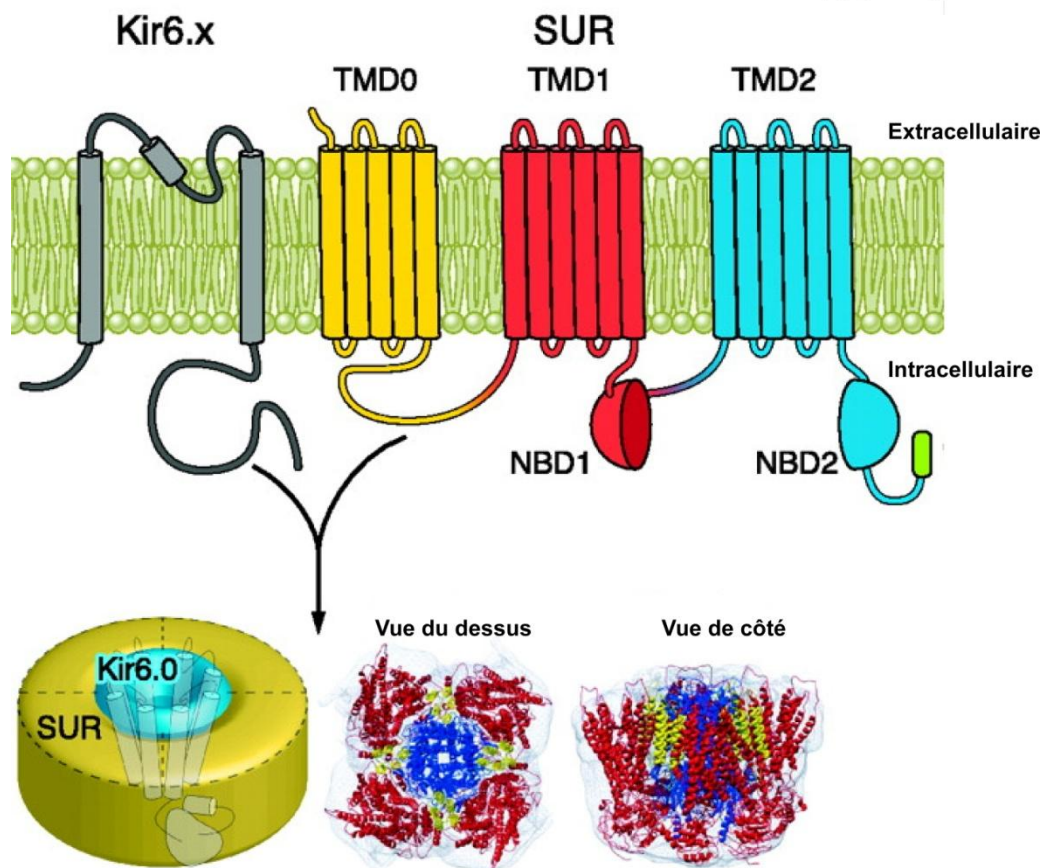
Les canaux potassiques à six segments transmembranaires s'associent avec une grande variété de protéines qui peuvent avoir de nombreux effets sur leurs propriétés. Ces interactions protéiques, qui ne sont pas toutes présentées ici, apportent un niveau de régulation supplémentaire aux courants générés par les sous-unités  $\alpha$  de cette famille, participant ainsi à l'immense diversité de courants potassiques retrouvée.

## **II.2 LES PROTEINES ASSOCIEES AUX CANAUX POTASSIQUES A 2 SEGMENTS TRANSMEMBRANAIRES**

### **II.2.1 Régulation des canaux $K_{ATP}$ ( $Kir_{6.x}$ ) par les récepteurs aux sulphonylurés**

Le canal  $K_{ATP}$  joue un rôle de senseur de l'état métabolique de la cellule et permet de coupler l'excitabilité membranaire au niveau énergétique de la cellule. En effet, ces canaux étant des canaux potassiques, leur ouverture permet de modifier le niveau d'excitabilité de la cellule. Lorsqu'ils sont ouverts, les ions  $K^+$  sortent de la cellule et celle-ci s'hyperpolarise provoquant un raccourcissement des potentiels d'actions en cas d'activité. Inversement quand ces canaux sont fermés, la conséquence est une dépolarisation qui favorise la formation de potentiels d'actions. On dit que ces canaux sont des senseurs métaboliques car leur ouverture est provoquée par une augmentation de la concentration intracellulaire d'ADP alors qu'une augmentation de la concentration intracellulaire d'ATP les ferme (Nichols, 2006).

Ces canaux sont présents sous forme d'octomères à la membrane des cellules qui les expriment : pancréas, cœur, muscles, vaisseaux... Ils sont composés de quatre sous-unités  $\alpha$ ,  $Kir_{6.x}$  et de quatre sous-unités associées, qui sont les récepteurs aux sulphonylurés : SUR (Seino, 1999). La sous-famille  $Kir_{6.x}$  possède deux isoformes :  $Kir_{6.1}$  et  $Kir_{6.2}$ , qui ne sont pas exprimées dans les mêmes tissus (Inagaki *et al.*, 1995). Les quatre autres composants de ce complexe sont les sous-unités SUR qui, en s'associant à  $Kir_{6.x}$ , modulent l'activité du canal.



**Figure 51 : Organisation du canal K<sub>ATP</sub>.**

Topologie membranaire de la sous-unité Kir<sub>6.x</sub> formant le pore du canal et la sous-unité SUR. Chaque sous-unité SUR possède deux domaines de liaison aux nucléotides (NBD). Un canal K<sub>ATP</sub> est composé de 4 sous-unités Kir<sub>6.x</sub> et 4 sous-unités SUR (schéma en bas à gauche). En bas à droite, structure tridimensionnelle du complexe K<sub>ATP</sub>. Les sous-unités Kir<sub>6.x</sub> sont représentées en bleu, et les sous-unités SUR en rouge (modifiée d'après Hibino, et al., 2010).

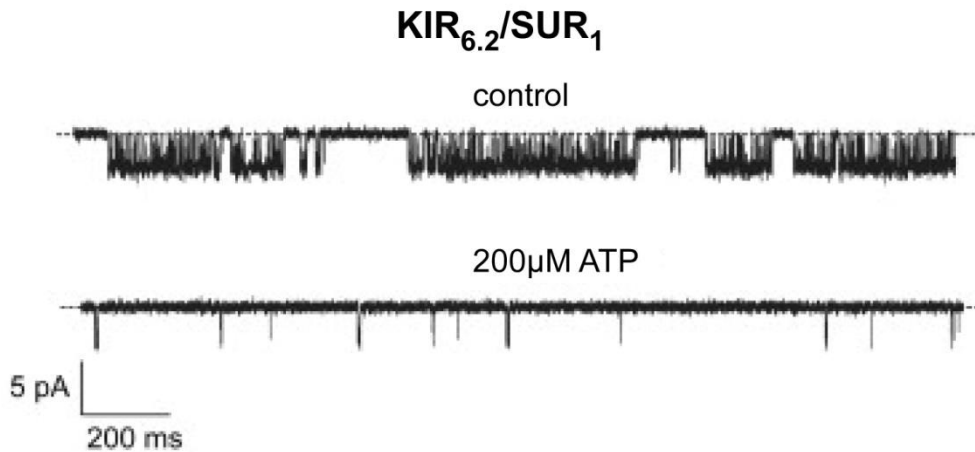
Les récepteurs aux sulphonylurés, appartiennent à la famille des protéines ABC (ATP-Binding Cassette protéine) mais ne présentent pas d'activité de transport contrairement aux autres membres tels que le CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator) (Aleksandrov *et al.*, 2007). Il existe deux isoformes de SUR : SUR<sub>1</sub> et SUR<sub>2</sub> qui sont issues de deux gènes différents (Aguilar-Bryan *et al.*, 1995). SUR<sub>2</sub> génère 2 variants d'épissage : SUR<sub>2A</sub> et SUR<sub>2B</sub> qui présentent 97% d'identité, la seule différence étant la présence ou non des 42 derniers acides aminés. La distribution et la sensibilité aux sulphonylurés de ces isoformes n'est pas la même.

Les récepteurs SUR sont de très grosses protéines d'environ 1600 acides aminés. Les 3 isoformes présentent la même topologie avec des extrémités N- et C- cytosoliques, trois domaines transmembranaires : TMD0, TMD1 et TMD2 composés respectivement de 5, 6 et 6 hélices transmembranaires, et de deux domaines de liaison aux nucléotides (NBD1 et NBD2) présentant les motifs Walker A et Walker B, ainsi que la signature ABC (Inagaki *et al.*, 1996). Même si la structure cristallographique de ce complexe n'est pas connue, il est admis que les sous-unités Kir<sub>6,x</sub>, qui constituent le pore de K<sub>ATP</sub> soient localisées de façon centrale, alors que les sous-unités SUR se trouvent à la périphérie (Clement *et al.*, 1997) (Inagaki *et al.*, 1997). Chaque sous-unité Kir<sub>6,x</sub> est liée *via* son extrémité N-terminale au domaine L0, c'est-à-dire la boucle située entre TMD0 et TMD1 d'une sous-unité SUR (Figure 51).

La liaison de Kir<sub>6,x</sub> avec SUR a deux conséquences majeures.

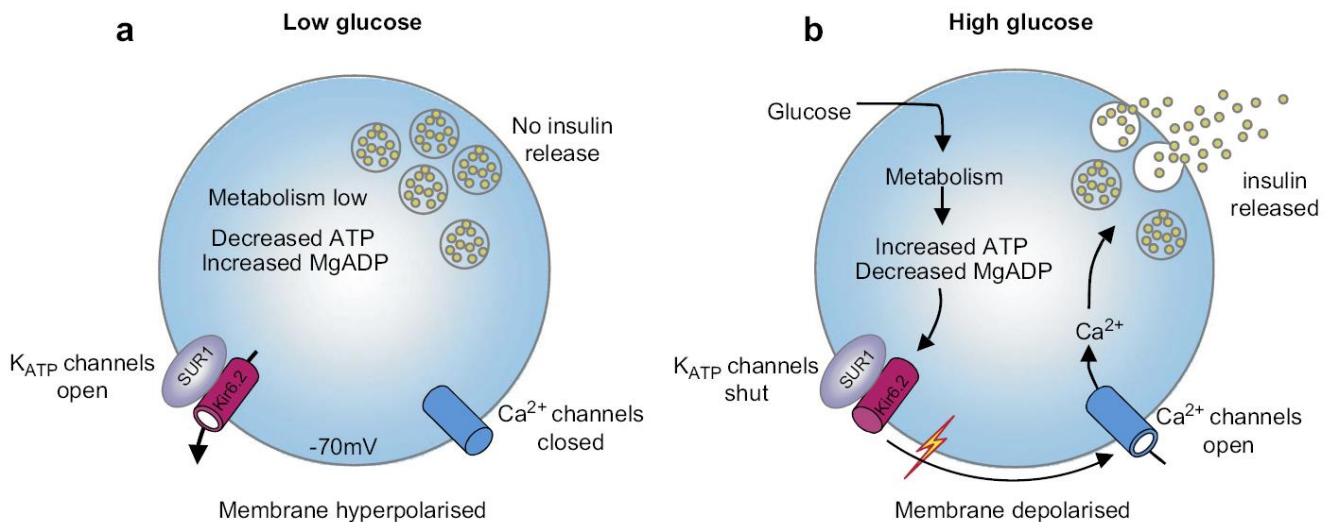
1) Elle rend possible la translocation du canal à la membrane plasmique (Zerangue *et al.*, 1999). Le trafic intracellulaire de ce canal est tout à fait remarquable, puisque les deux composants : Kir<sub>6,x</sub> et SUR possèdent un signal de rétention dans le réticulum endoplasmique de type R-K-R. Ces résidus sont masqués lorsqu'une dimérisation correcte s'effectue entre les deux partenaires : une sous-unité SUR et une sous-unité Kir<sub>6,x</sub>. SUR participe donc à l'expression correcte de son canal associé à la membrane plasmique.

2) De plus, l'interaction de SUR avec Kir<sub>6,x</sub> modifie les propriétés de ce dernier. Il est possible d'exprimer le canal Kir<sub>6,2</sub> seul à la membrane dans les systèmes d'expression hétérologue, en déléant le signal de rétention (Tucker *et al.*, 1997). Grâce à ce subterfuge, nous connaissons l'apport de SUR à Kir<sub>6,x</sub>. En premier lieu, le récepteur SUR augmente la probabilité d'ouverture du canal (de 0.1 à 0.4). L'affinité du canal pour l'ATP est également augmentée de 10 fois, ainsi, la concentration en ATP nécessaire pour inhiber le canal de moitié passe de 100µM à 10µM. C'est aussi la sous-unité SUR qui confère la sensibilité de K<sub>ATP</sub> à de nombreux agents pharmacologiques utilisés en clinique tels que les sulphonylurés (Gribble and Reimann, 2003), qui inhibent le canal et qui sont utilisés dans le traitement du diabète, ainsi que les ouvreurs des canaux potassiques (diazoxide) (Ashcroft and Gribble, 2000) utilisés dans le traitement de l'hyperinsulinémie et dans certaines formes



**Figure 52 : Inhibition du courant  $K_{ATP}$  par l'ATP.**

Enregistrements en configuration inside-out à -60 mV. La présence de 200µM d'ATP inhibe fortement ce canal (modifiée d'après Proks *et al.*, 2009).



**Figure 53 : Stimulation de la sécrétion d'insuline dans les cellules  $\beta$  pancréatiques.**

a. Les canaux  $K_{ATP}$  sont ouverts quand la concentration extracellulaire en glucose et le métabolisme cellulaire sont faibles. La membrane est alors hyperpolarisée, ce qui maintient les canaux  $Ca^{2+}$  dépendants du voltage fermés et inhibe la sécrétion d'insuline.

b. Quand la concentration extracellulaire en glucose augmente, le métabolisme cellulaire génère de l'ATP, ce qui inhibe les canaux  $K_{ATP}$ . Cela mène à une dépolarisation de la membrane, une ouverture des canaux  $Ca^{2+}$  voltage-dépendant. La concentration intracellulaire en  $Ca^{2+}$  va alors augmenter et stimuler alors la sécrétion d'insuline (d'après Proks *et al.*, 2009).

d'hypertension, qui eux activent le canal (Moreau *et al.*, 2005). De plus, cette expérience a permis de montrer que la sensibilité du canal à l'ATP est apportée par la sous-unité Kir<sub>6.x</sub> alors que c'est SUR qui amène la sensibilité à l'ADP (Mg-ADP).

Le canal K<sub>ATP</sub> est donc fermé par la fixation d'ATP sur les sous-unités Kir<sub>6.x</sub> (Figure 52). La liaison de Mg-ADP sur les sous-unités SUR, au niveau des deux sites NBD va au contraire ouvrir le canal et ceci à la faveur d'un changement conformationnel de tout le complexe (Proks and Ashcroft, 2009).

Les canaux K<sub>ATP</sub> ont été identifiés dans de nombreux tissus (muscles, neurones...) mais là où leur rôle est le mieux compris est les cellules  $\beta$  du pancréas, responsables du couplage entre la glycémie et la libération d'insuline *via* des modifications du potentiel de membrane. Lorsque le taux de glucose est bas ([ADP] élevée), les canaux K<sub>ATP</sub> sont ouverts (Ashcroft and Kakei, 1989; Ashcroft and Rorsman, 1989). Ils génèrent alors un courant sortant important et le potentiel de membrane est proche du potentiel d'équilibre de l'ion K<sup>+</sup> (-70 mV). En revanche, si le taux de glucose augmente, les canaux K<sub>ATP</sub> sont fermés par la liaison d'ATP sur Kir<sub>6.x</sub>. Les courants sortants diminuent alors fortement, et ce sont les courants entrants qui dominent favorisant une dépolarisation de la cellule. Les canaux calciques voltage-dépendant vont alors s'ouvrir, entraînant une entrée de calcium responsable de la sécrétion d'insuline (Figure 53). C'est de cette façon que les sulphonylurés, qui inhibent les canaux K<sub>ATP</sub>, produisent leur effet thérapeutique dans le traitement du diabète : en augmentant la libération d'insuline. L'association du canal Kir<sub>6.x</sub> avec les récepteurs SUR permet donc de réguler finement la libération d'insuline. On imagine aisément que toute mutation qui modifierait la localisation ou la sensibilité aux nucléotides de ce complexe aura des conséquences importantes d'un point de vue physiologique.

Des mutations sur SUR<sub>1</sub> ou sur Kir<sub>6.2</sub> sont effectivement associées à des désordres métaboliques sévères. L'un d'entre eux est l'hypoglycémie hyperinsulinémique persistante congénitale (PHHI) (Aittoniemi *et al.*, 2009). Cette pathologie est caractérisée par une sécrétion d'insuline excessive et donc des hypoglycémies sévères. La majorité des mutations responsables de cette condition ont été trouvées sur SUR<sub>1</sub> et causent une perte de fonction de la sous-unité, pouvant provenir de deux phénomènes : un défaut de synthèse ou d'adressage qui entraîne une diminution de l'expression à la surface ou alors la perte de sensibilité au Mg-ADP. Dans les deux cas, les cellules  $\beta$  restent dépolarisées et sécrètent de l'insuline.



La perte de fonction de l'activité des canaux  $K_{ATP}$  entraîne une hypersécrétion d'insuline, un gain de fonction provoquera l'inverse, à savoir une sécrétion d'insuline diminuée. Ces mutations qui ont pour conséquence la perte de sensibilité à l'ATP ou une stabilité intrinsèque améliorée de l'état ouvert vont provoquer des diabètes et notamment le diabète néonatal (Nichols, 2006).

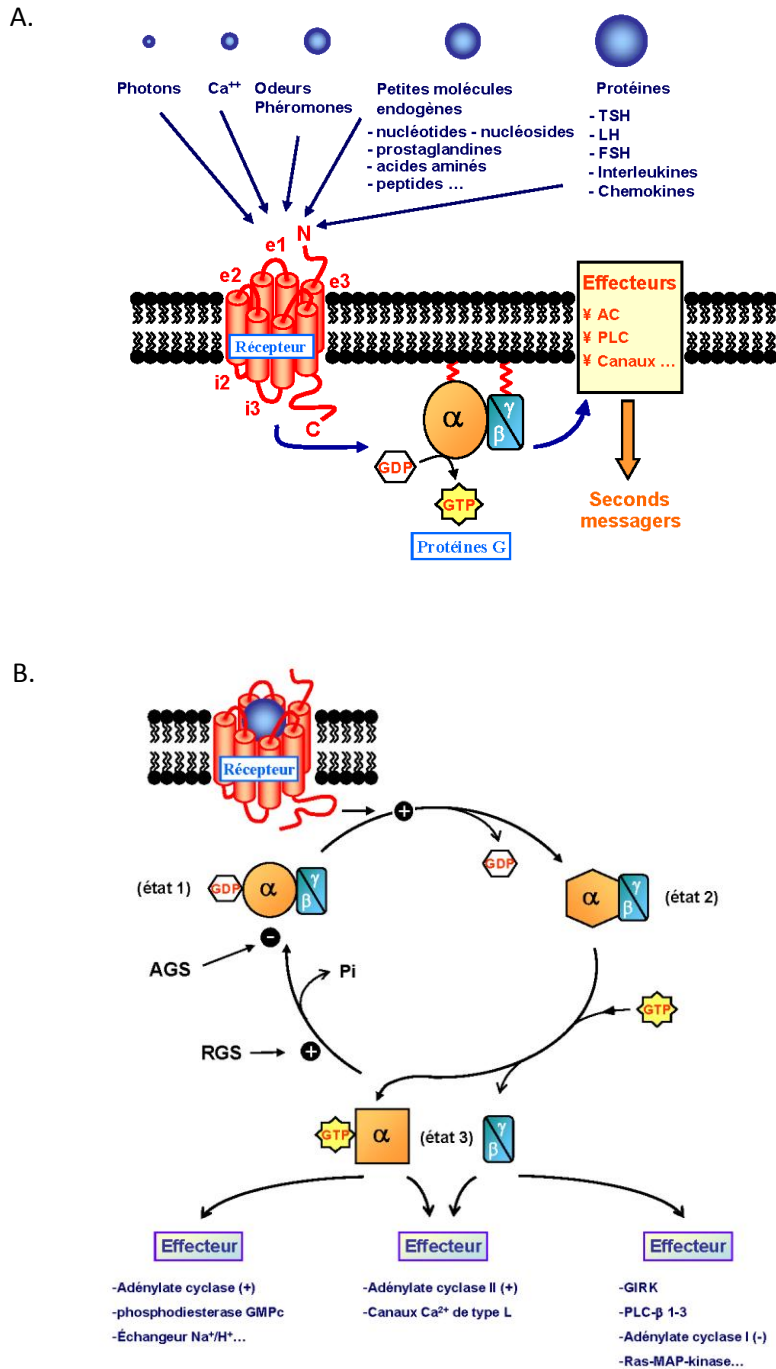
Le canal  $K_{ATP}$  est également exprimé dans le cerveau où il résulte de l'association de  $Kir_{6.1}$  ou  $Kir_{6.2}$  avec  $SUR_1$  ou  $SUR_{2B}$ , en fonction des régions. Dans le cortex, l'hippocampe et le striatum, les canaux  $K_{ATP}$  protègent les neurones contre certains stress métaboliques tels que l'hypoxie ou les ischémies (Ballanyi, 2004). Ils servent également de capteur de glucose dans les neurones de l'hypothalamus qui ont un rôle essentiel dans le maintien de la glycémie. Ces canaux participent à la régulation hypothalamique de la sécrétion de glucagon, où ils agissent de concert avec les  $K_{ATP}$  des cellules  $\beta$  comme capteurs centraux et périphériques afin de contrôler et réguler l'homéostasie du glucose (Lee *et al.*, 1999).

Nous voyons donc un exemple d'association entre un canal et une protéine qui est ici un récepteur transmembranaire. Ce partenariat est essentiel, non seulement pour permettre l'expression du canal à la membrane mais également pour apporter au canal ainsi formé ( $K_{ATP}$ ) de nouvelles régulations importantes.

## II.2.2 Régulation des canaux GIRK ( $Kir_{3,x}$ ou $K_G$ ) par les protéines G

La sous-famille des canaux GIRK compte 4 membres :  $GIRK_{1-4}$ . Ces canaux se tétramérisent, soit sous forme d'homomères soit sous forme d'hétéromères, pour former un canal fonctionnel. Leur distribution tissulaire n'étant pas homogène, la composition des canaux  $K_G$  est différente d'un tissu à l'autre. Le canal de cette famille le mieux connu et le plus étudié est le canal  $K_{ACH}$ , présent dans les myocytes cardiaques de l'oreillette, et formé par l'association des sous-unités  $GIRK_1$  et  $GIRK_4$ . Ce canal est activé par l'acétylcholine. Lorsque le nerf vague est stimulé, ses terminaisons axonales libèrent de l'acétylcholine, qui, en se fixant sur ses récepteurs va ralentir le rythme cardiaque. Cet effet passe par une hyperpolarisation des cellules pacemaker du cœur, les myocytes atriaux. A la fin des années 70, Tautwein (Noma and Trautwein, 1978) a montré que l'hyperpolarisation est due à un courant potassique qu'il a nommé  $K_{ACH}$ .





**Figure 54 : Les récepteurs couplés aux protéines G.**

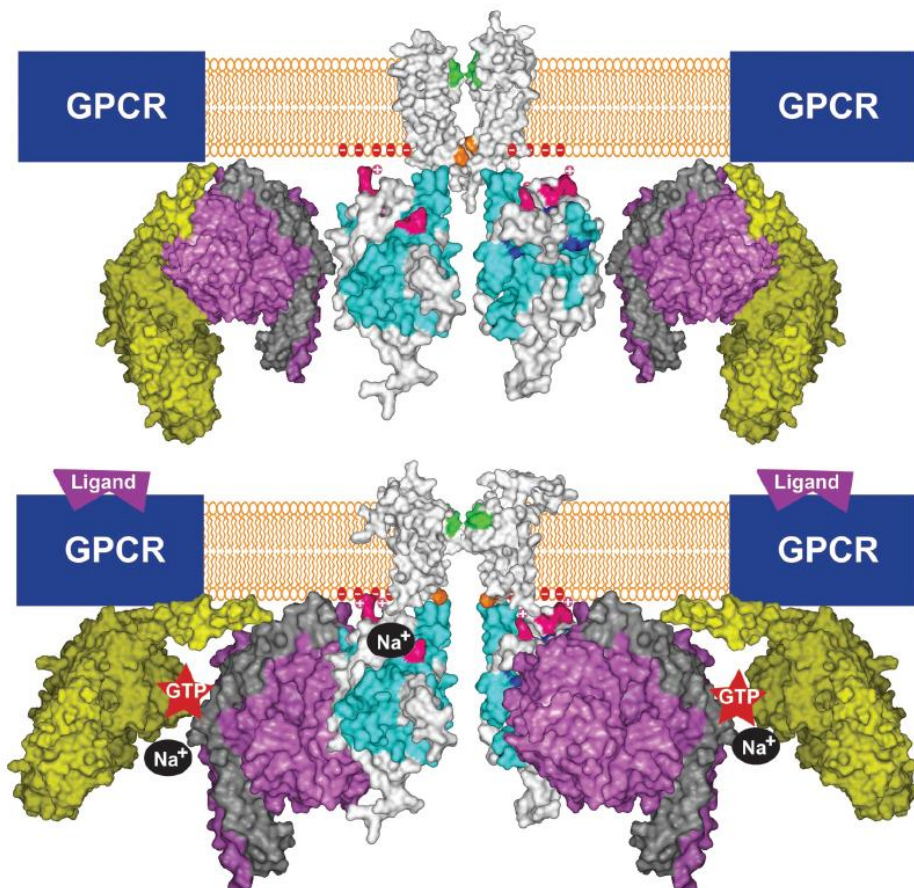
A. Ce sont des récepteurs membranaires constitués de 7 hélices transmembranaires. La liaison de molécules, de nature très variées sur la face extracellulaire permet l'activation au niveau intracellulaire de la protéine G, grâce à un échange GDP/GTP. Les protéines G activées, agissent à leur tour sur différents effecteurs responsables d'effets intracellulaires (modifiée d'après *Bockaert et al.*, 1999).

B. Cycle d'activation des protéines G hétérotrimériques. Dans son état actif, un RCPG peut activer une protéine G, la faisant passer d'un état trimérique lié au GDP (état1) à un état actif lié au GTP (état 3). La liaison du GTP entraîne d'une part la dissociation du complexe récepteur-protéine G et d'autre part la dissociation de la protéine G en ses deux sous-unités  $G_\alpha$  et  $G_{\beta\gamma}$  (d'après Maurel D.).

La particularité des sous-unités GIRK, qui leur a d'ailleurs valu leur nom est d'être activées par les protéines G et plus particulièrement les protéines  $G_{0/i}$  qui sont inhibées par la toxine pertussique (Wickman and Clapham, 1995). Les protéines G sont elles-mêmes activées par leur récepteur (RCPG : récepteur couplé aux protéines G) lorsqu'un agoniste se fixe sur celui-ci (hormone ou neurotransmetteur). Cette liaison provoque la libération de deux molécules cytosoliques effectrices :  $G_\alpha$  et  $G_{\beta\gamma}$ , responsables de différents processus cellulaires, telle que la stimulation spécifique de certaines voies de signalisation. En absence d'agoniste,  $G_\alpha$  est lié à GDP et le complexe  $G_{\alpha\beta\gamma}$  est fixé à son récepteur. Par contre, lorsque le RCPG est stimulé par un agoniste, l'échange GTP/GDP s'accélère, engendrant alors la séparation des sous-unités  $G_\alpha$  et  $G_{\beta\gamma}$  qui produisent alors leur effet. Le signal d'activation se termine quand  $G_\alpha$ -GTP est hydrolysé en  $G_\alpha$ -GDP qui est alors de nouveau capable de lier  $G_{\beta\gamma}$  avec une très grande affinité (*Figure 54*).

Dans le cas du canal  $K_{ACH}$ , c'est la fixation de l'acétylcholine sur le récepteur muscarinique  $M_2$  qui va l'activer et entraîner l'hyperpolarisation de la cellule. Une telle activation peut être engendrée par deux procédés différents, dont un indirect *via* les effecteurs des protéines G. Par exemple, l'activation des protéines  $G_{\alpha q}$  provoque une augmentation de l'activité de la phospholipase C, entraînant la dégradation du  $PIP_2$ , qui peut alors affecter le fonctionnement de certains canaux ioniques. Mais les canaux GIRK sont régulés de façon directe par les protéines G, ce qui est beaucoup plus rare. Ils sont effectivement activés par la liaison directe de la sous-unité  $G_{\beta\gamma}$  sur la sous-unité GIRK. Cette interaction a été mise en évidence par plusieurs groupes en 1995 (Huang *et al.*, 1995; Krapivinsky *et al.*, 1995; Vivaudou *et al.*, 1997). Les sites d'interaction de  $G_{\beta\gamma}$  sur GIRK sont maintenant connus, grâce notamment à la structure cristallographique de la partie cytosolique de  $Kir_{3.1}$ . Deux résidus dans la partie C-terminale et un dans l'extrémité N-terminale ont été identifiés comme étant responsables du gating du canal mais aussi de la liaison de la sous-unité  $G_{\beta\gamma}$  et de l'activation qui en résulte. L'interaction des sous-unités  $G_{\beta\gamma}$  avec le canal GIRK implique donc de multiples sites d'interactions qui fonctionnent de façon coopérative pour contrôler l'activité et le "gating" du canal (Sadjia *et al.*, 2003).

Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer l'augmentation des courants GIRK enregistrée suite à l'activation du RCPG. Une des théories développée suggère que les canaux  $K_G$  soient inhibés de façon intrinsèque par leurs propres domaines C et/ou N ; la liaison de  $G_{\beta\gamma}$  pourrait alors activer le canal en stoppant cette inhibition (Dascal *et al.*, 1995). Plus récemment, il a été suggéré que  $G_{\beta\gamma}$  puisse réguler l'activité des canaux GIRK en modulant l'affinité du canal pour  $PIP_2$ . En effet, quand  $PIP_2$  est retiré de la membrane plasmique, les canaux  $K_G$  s'inactivent et ne peuvent plus être activés par l'application de  $G_{\beta\gamma}$  seul. De la même façon, l'application de  $PIP_2$  entraîne une augmentation des courants  $K_G$  avec une cinétique de quelques minutes. Les mécanismes d'action de ces deux composés



**Figure 55 : Représentation schématique de l'ouverture du canal Kir<sub>3.4</sub> en réponse à l'activation d'un récepteur couplé aux protéines G.**

En haut, le canal Kir<sub>3.4</sub> est inséré dans la membrane plasmique et se trouve dans un état fermé. Les sous-unités Kir<sub>3.4</sub> sont représentées en blanc. Les domaines d'interaction du canal avec les protéines G sont représentés en bleu. La protéine G, non activée est liée à son RCPG (GPCR). G<sub>α</sub> est en jaune, G<sub>γ</sub> en rose et G<sub>β</sub> en gris.

Le schéma en bas montre un canal Kir<sub>3.4</sub> ouvert. Un ligand s'est fixé sur son RCPG, activant la protéine G associée, c'est à dire le remplacement du GDP par un GTP sur la sous-unité G<sub>α</sub> et la dissociation du dimère G<sub>βγ</sub>. Ce dimère va alors interagir avec le domaine cytoplasmique de Kir<sub>3.4</sub>, exerçant une force sur la structure du canal et obligeant son ouverture (d'après *Mirshahi et al.*, 2003).

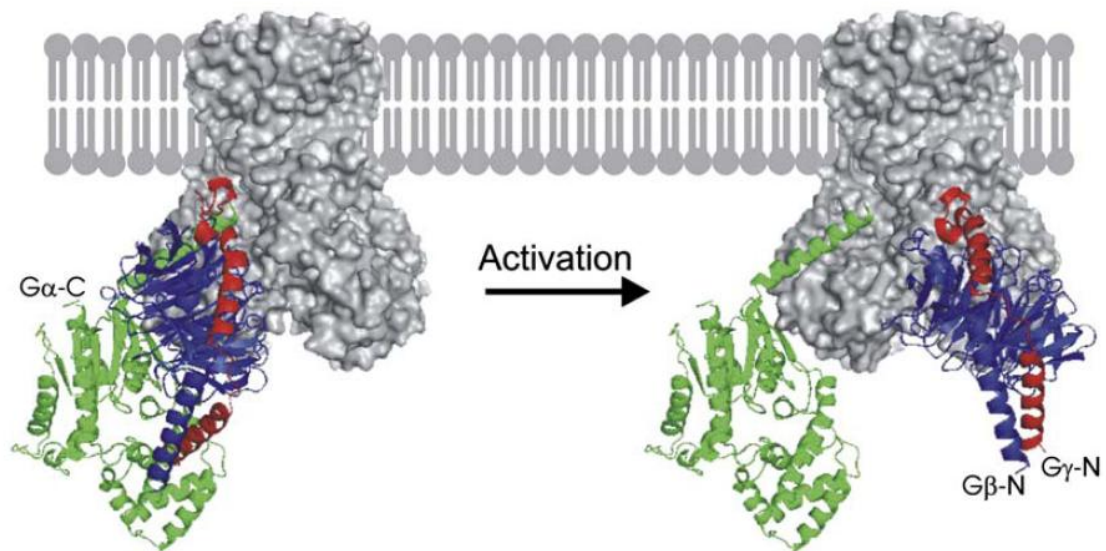
fonctionnent donc de façon similaire sur le canal  $K_G$ . Il est en effet probable que la liaison de  $G_{\beta\gamma}$  sur la partie cytosolique de  $K_G$  entraîne un changement de conformation qui modifierait alors son affinité pour  $PIP_2$  (Figure 55).

Certaines études récentes ont montré que  $G_\alpha$  est également capable de se fixer sur les sous-unités  $\alpha$  des canaux GIRK. Cela a été montré par diverses techniques, notamment de microscopie (TIRF et FRET) et de co-immunoprécipitation (Clancy *et al.*, 2005) (Riven *et al.*, 2006). La sous-unité  $G_\alpha$ , de même que la forme hétérotrimérique de la protéine G sont capables de se lier à la partie cytosolique du canal GIRK. Riven *et al.* ont montré qu'il existe un complexe canal/ $G_{\alpha\beta\gamma}$ , nommé "complexe préformé" présent au repos au niveau de la membrane plasmique (Figure 56). Ils ont également montré que la liaison du ligand sur son récepteur entraîne un changement conformationnel du complexe  $G_{\alpha\beta\gamma}$  capable de déclencher l'ouverture du canal.

La formation de ce précomplexe pourrait expliquer une question posée depuis la découverte des canaux  $K_{ACH}$  : d'où vient la spécificité et la rapidité d'action de l'acétylcholine sur le canal  $K_{ACH}$ ? Quel est le mécanisme régissant l'activation spécifique de GIRK par les RCPG inhibiteurs couplés à la protéine  $G_{i/o}$ ? De plus, le dimère  $G_{\beta\gamma}$  diffuse lentement au niveau de la membrane plasmique, et cette réponse serait trop lente comparée à celle enregistrée pour les canaux  $K_{ACH}$ . Quel mécanisme permet une réponse si rapide?

L'une des explications envisageable serait la liaison permanente du trimère  $G_{\alpha\beta\gamma}$  au canal à l'état de repos, très proche du RCPG qui lui est associé (Riven *et al.*, 2006). Lorsque le ligand se fixe sur le RCPG,  $G_{\alpha\beta\gamma}$  est activée et  $G_{\beta\gamma}$  se désolidarise du complexe pour agir sur le canal tout proche. La translocation de  $G_{\beta\gamma}$  va provoquer une modification conformationnelle et l'ouverture du canal. La formation d'un complexe préformé permettrait de former de gros complexes où l'activateur et l'effecteur se trouveraient à proximité l'un de l'autre. Ce mécanisme pourrait donc expliquer la rapidité de l'activation entraînée par la liaison du ligand dans les tissus natifs. Il explique également le fait que les canaux GIRK ne soient activés que par la protéine G inhibitrice.

Cependant, une nouvelle question se pose, comment est assurée la stabilité de tels complexes protéiques? Ce type de complexe nécessite une organisation spatiale précise. Tous ces éléments pourraient être liés entre eux par une autre protéine, d'échafaudage par exemple, qui permettrait alors de les maintenir à une distance suffisamment proche pour qu'un signal qui arrive sur la cellule soit très rapidement transmis dans le cytosol aux effecteurs désignés.



**Figure 56 : Schéma décrivant la probable organisation du canal GIRK associé à une protéine G avant et après activation du récepteur.**

Le trimère de protéine G ( $G_\alpha$  en vert,  $G_\beta$  en bleu et  $G_\gamma$  en rouge) est étroitement associé au canal au repos. Après l'activation du récepteur, la protéine G est activée par le remplacement de son GDP en GTP sur la sous-unité  $G_\alpha$ . Le dimère  $G_{\beta\gamma}$  se dissocie alors de  $G_\alpha$  et change de position. C'est ce changement de conformation qui va permettre l'ouverture du canal (d'après Riven *et al.*, 2006).

Une telle explication est probable puisqu'elle a été démontrée pour la sous-unité Kir<sub>3,2c</sub> qui est liée à une protéine d'échafaudage (Hibino *et al.*, 2000). Cette sous-unité a la particularité de ne pas être activée par l'application de G<sub>βγ</sub> dans les systèmes d'expression hétérologue. En revanche, lorsque celui-ci est exprimé avec la protéine SAP-97 (Synapse Associated Protein-97), une protéine d'échafaudage, le canal retrouve une sensibilité aux protéines G, et ceci certainement parce que SAP-97 permet de lier l'effecteur, c'est-à-dire le canal, à son activateur, la protéine G.

Il a également été suggéré l'idée que les canaux GIRK puissent être régulés par une famille de protéines cytosolubles nommées RGS (Regulator of G protein Signaling) qui ont un rôle de régulateur des protéines G. Elles sont capables par exemple d'accélérer l'hydrolyse du GTP mettant ainsi fin à la stimulation (Hepler, 1999). Il semblerait que ces protéines RGS soient localisées dans les mêmes complexes que les canaux et leurs protéines G associées, formant ainsi des microdomaines (Zhang *et al.*, 2002). La formation de ces microdomaines pourrait également dépendre de protéines d'échafaudage qui n'ont pas encore été identifiées.

Toutefois, la liaison directe de G<sub>α</sub> sur le canal reste controversée, et de nouvelles expériences seront nécessaires pour comprendre le mécanisme global d'activation des canaux GIRK. Il est par contre bien admis aujourd'hui, après de nombreuses années de discordes, que ces canaux sont activés par une liaison directe des sous-unités G<sub>βγ</sub> provenant de protéines G<sub>i/o</sub>.

### II.2.3 Localisation subcellulaire des canaux Kir grâce à l'interaction de protéines à domaine PDZ

Les canaux Kir ont un rôle important dans le cerveau puisqu'ils produisent les potentiels lents inhibiteurs post-synaptiques (Inanobe *et al.*, 2002). Si ces canaux sont ouverts, ces potentiels vont favoriser une baisse de l'excitabilité du neurone post-synaptique. Leur localisation subcellulaire précise est donc essentielle pour que la transmission synaptique se réalise correctement.

Les sous-unités Kir<sub>2,x</sub> ont une localisation subcellulaire spécifique dans les neurones et les cellules épithéliales qui les expriment. Dans les neurones par exemple elles ont été identifiées dans les corps cellulaires et les dendrites. Dans les bulbes olfactifs de souris, Kir<sub>2,3</sub> est spécifiquement exprimé au niveau de la membrane post-synaptique des épines dendritiques et ceci dans les cellules granulaires qui reçoivent en grande majorité des influx

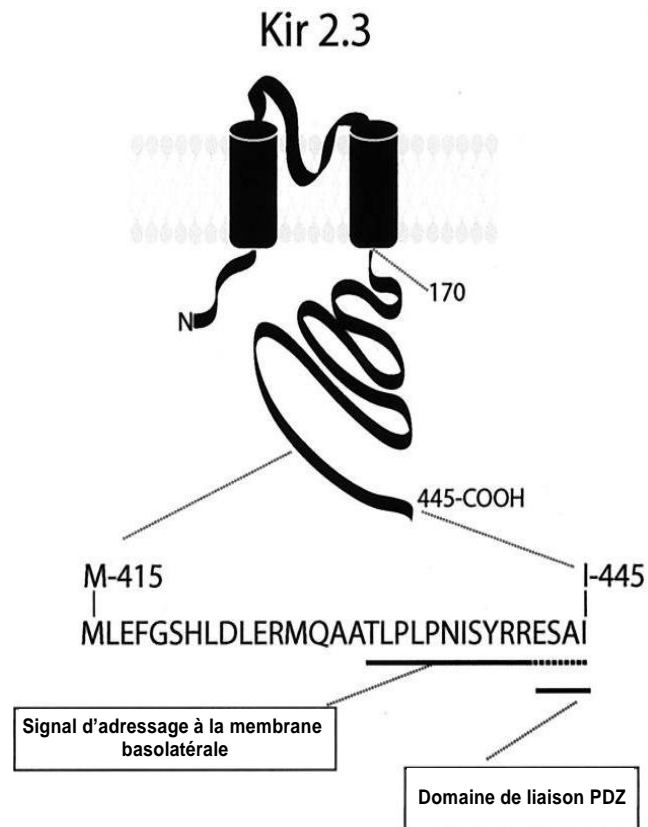


excitateurs (Inanobe *et al.*, 2002). Au niveau des densités post-synaptiques ce sont souvent les protéines à domaine PDZ qui sont impliquées dans l'adressage des protéines. De plus, les sous-unités Kir<sub>2,x</sub> possèdent au niveau de leur extrémité C-terminale une séquence de reconnaissance par les domaines PDZ (X-S/T-X-V/I) (Songyang *et al.*, 1997). Plusieurs études ont montré qu'il existe bien une interaction entre les sous-unités Kir<sub>2,x</sub> et des protéines à domaines PDZ.

PSD-95 interagit avec l'extrémité C-terminale des sous-unités Kir<sub>2,1</sub> et Kir<sub>2,3</sub> au niveau de la densité post-synaptique. Des expériences d'immunoprécipitation ont permis de vérifier que ces complexes existent bel et bien dans le cerveau *in vivo* (Inanobe *et al.*, 2002) (Cohen *et al.*, 1996). Grâce à leurs propriétés et à cette localisation particulière, ces sous-unités participent à l'établissement du potentiel de repos des épines dendritiques, permettant le maintien du récepteur NMDA dans un état fermé lorsque le neurone n'est pas stimulé. En revanche, la fermeture de ces canaux, par un mécanisme de régulation quelconque, augmente l'excitabilité du neurone. Si cette fermeture coïncide avec l'activité de la synapse excitatrice, la dépolarisation du neurone post-synaptique sera alors longue et profonde, permettant l'activation des récepteurs NMDA et la transmission de l'information. La particularité de l'interaction entre PSD-95 et Kir<sub>2,3</sub> est sa dépendance vis à vis de la protéine kinase A. Le motif reconnu par PSD-95, situé au niveau de l'extrémité C-terminale de Kir<sub>2,3</sub>, contient une sérine. Lorsque ce résidu est phosphorylé par PKA, l'interaction entre PSD-95 et Kir<sub>2,3</sub> est interrompue. Un changement de l'adressage du canal Kir<sub>2,3</sub> peut modifier l'excitabilité de la membrane post-synaptique, ce qui est souvent lié à une forme plasticité de synaptique dans ces cellules.

Kir<sub>2,3</sub> est donc localisé dans les densités post-synaptiques des neurones grâce à son interaction avec la protéine à domaine PDZ, PSD-95. Mais Kir<sub>2,3</sub> n'est pas seulement un canal neuronal, il est également exprimé dans certaines cellules épithéliales de rein (Welling, 1997). Ces cellules polarisées ont un rôle primordial dans le contrôle de l'homéostasie de nombreux fluides et électrolytes, et ceci en réabsorbant ou en excréant spécifiquement certains ions. Les transporteurs et autres canaux ioniques doivent donc être adressés de façon précise et être retenus dans le compartiment où ils produiront leur effet. Il est actuellement admis que l'adressage de telles protéines résulte de l'addition de deux signaux d'adressage. Le premier permet en fait l'export de la protéine depuis le Golgi vers un compartiment particulier, par exemple, la membrane apicale ou la membrane basolatérale. Ce transport se fait par l'intermédiaire de vésicules différentes en fonction de la destination de la protéine. Une fois délivrée au compartiment approprié, le second signal va permettre à





**Figure 57 : Le canal Kir<sub>2.3</sub> et ses signaux d'adressage.**

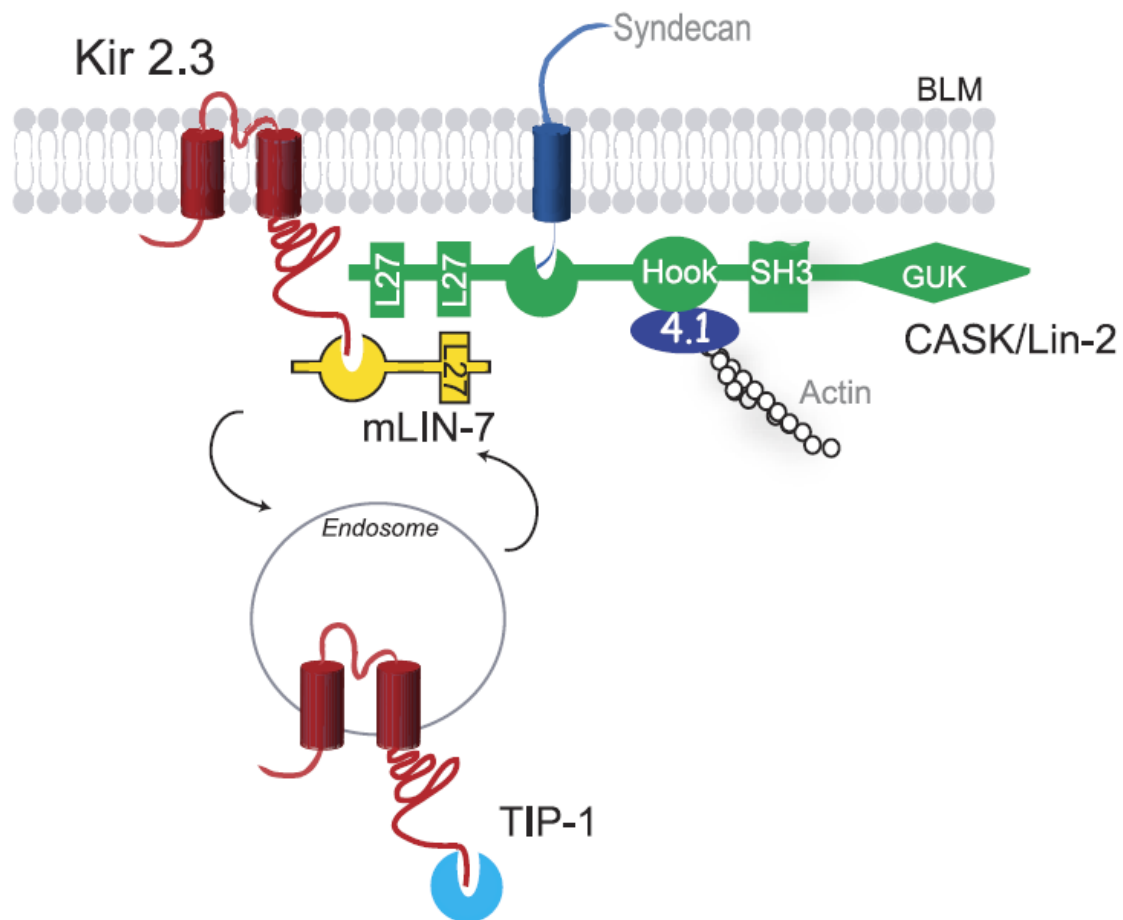
Les 4 derniers résidus de l'extrémité C-terminale sont un domaine de liaison PDZ et les 11 résidus qui précèdent sont un signal d'adressage vers la membrane basolatérale (modifiée d'après *Le Maout et al.*, 2001).

la protéine d'être maintenue à cet emplacement, et ceci grâce à l'association d'autres protéines, d'ancrage, d'échafaudage, ou encore du cytosquelette.

Le canal Kir<sub>2.3</sub> est détecté au niveau de la membrane basolatérale des cellules épithéliales des tubules collecteurs du rein, ce qui est également le cas lorsqu'il est exprimé dans des lignées de cellules épithéliales de rein en culture (Le Maout *et al.*, 2001). Il semble que cette localisation soit assurée par deux motifs situés dans l'extrémité C-terminale de Kir<sub>2.3</sub> (Figure 57).

Le premier à avoir été identifié par délétion progressive de l'extrémité C-terminale est une séquence de 11 acides aminés, qui, lorsqu'elle est déletée ou mutée, engendre une localisation de Kir<sub>2.3</sub> non plus à la membrane basolatérale des cellules mais à la membrane apicale. Ce motif est donc un signal d'export du Golgi vers la membrane. La localisation apicale de Kir<sub>2.3</sub> délété de cette séquence est surprenante, puisqu'on attendrait plutôt une absence d'adressage spécifique et une localisation diffuse ou une rétention dans le réticulum endoplasmique. Cela peut suggérer que l'adressage à la membrane apicale se fait par défaut, ce qui ne semble pas être le cas généralement, ou alors qu'il existe sur Kir<sub>2.3</sub> un autre signal d'adressage à la membrane apicale qui soit en permanence réprimé par la séquence de 11 résidus de l'extrémité C-terminale (Le Maout *et al.*, 2001).

Il existe un second signal, porté par une séquence de quatre résidus situés à l'extrémité de la partie C-terminale. Ce motif correspond à un site consensus de reconnaissance par certaines protéines à domaine PDZ. La délétion de ces résidus entraîne une relocalisation de Kir<sub>2.3</sub> dans des vésicules intracellulaires de type endosomes (Olsen *et al.*, 2002). Des expériences de biochimie ont montré que Kir<sub>2.3</sub> interagit avec une protéine à domaine PDZ nommée Lin-7 et localisée à la membrane basolatérale (Alewine *et al.*, 2007). La co-expression de Kir<sub>2.3</sub> avec Lin-7 dans les systèmes d'expression hétérologue entraîne une augmentation des courants macroscopiques Kir<sub>2.3</sub>, et ceci grâce à une plus grande stabilité du canal dans la membrane plasmique, soit par rétention, soit en accélérant le recyclage de celui-ci depuis les endosomes. Lin-7 est connue pour interagir avec une autre protéine d'ancrage, la protéine CASK (CALcium/calmodulin-dependant Serine protein Kinase), qui est elle aussi localisée dans la membrane basolatérale des cellules épithéliales. Des expériences de co-immunoprécipitation et d'immunocytochimie ont montré que ces trois protéines forment un complexe dans un système d'expression hétérologue, mais aussi que toutes trois sont détectées *in vivo* à la membrane basolatérale des cellules épithéliales des tubules collecteurs de rein. Lin-7 interagit avec CASK grâce à un domaine particulier, le domaine L27, ce qui lui permet de lier en même temps Kir<sub>2.3</sub> *via* son domaine PDZ, et CASK. Sans ce domaine, Lin-7 n'est plus capable de retenir le canal au niveau de la membrane et il



**Figure 58 : Schéma représentant l'interaction entre le complexe Lin-7/CASK et le canal Kir<sub>2.3</sub> à la membrane basolatérale.**

Lin-7 lie simultanément Kir<sub>2.3</sub> par un domaine d'interaction PDZ et CASK par son domaine L27. CASK est quant à lui ancré à la membrane basolatérale grâce à des interactions avec le cytosquelette d'actine et des récepteurs de la matrice extracellulaire, comme la protéine syndecan. TIP-1 peut également se lier au canal, et cette interaction envoie le canal dans les endosomes (d'après *Alewine et al.*, 2007).

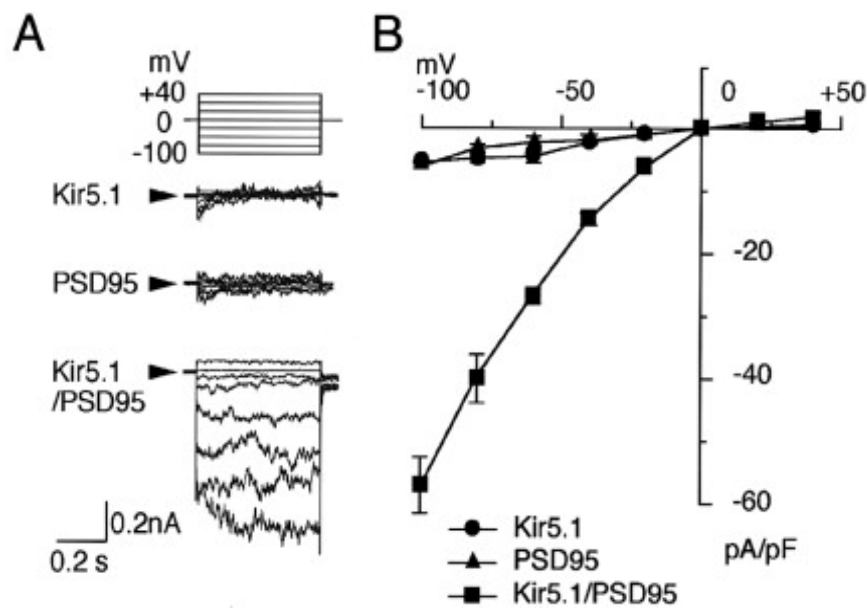
se retrouve alors dans des vésicules intracellulaires. C'est donc grâce à son interaction avec CASK que Lin-7 retient Kir<sub>2.3</sub> à la membrane basolatérale (Alewine *et al.*, 2007).

CASK est en effet une protéine d'ancrage qui est aussi capable d'interagir avec des récepteurs transmembranaires et des protéines du cytosquelette. C'est par ce type de coopération que des protéines telles que le canal Kir<sub>2.3</sub> peuvent être adressées et retenues dans un compartiment particulier. Cependant, certains points restent tout de même à élucider, et notamment la localisation de Kir<sub>2.3</sub> lorsque son domaine de reconnaissance par la protéine PDZ est tronqué. On pourrait s'attendre, comme précédemment à une localisation diffuse, ou encore à la présence de Kir<sub>2.3</sub> à la membrane apicale. Or ce n'est pas le cas, puisque dans ces conditions Kir<sub>2.3</sub> est retrouvé dans des vésicules intracellulaires. Cela suggère de nouveau que d'autres protéines sont susceptibles d'interagir avec le canal pour lui apporter cet adressage. Une hypothèse a été avancée à ce sujet. Il semblerait qu'une autre protéine à domaine PDZ, TIP-1 (Tax interacting Protein 1), qui aurait alors une action antagoniste à Lin-7, puisse interagir avec Kir<sub>2.3</sub> et permettre sa translocation dans ces vésicules intracellulaires (*Figure 58*) (Alewine *et al.*, 2007).

L'adressage de Kir<sub>2.3</sub> résulterait donc de l'action concertée ou antagoniste de diverses protéines d'ancrage. Selon le niveau d'expression des différents protagonistes ou encore d'autres phénomènes, tel que l'état de phosphorylation du canal, ces interactions seront plus ou moins fortes. Cela apporte un niveau supplémentaire de régulation au canal puisqu'en modifiant ainsi son adressage, c'est toute la physiologie de la cellule qui peut être modulée (Alewine *et al.*, 2007) (Olsen *et al.*, 2002) (Leonoudakis *et al.*, 2004).

L'exemple du canal Kir<sub>2.3</sub> est particulier, puisque nous voyons qu'un même canal, exprimé dans deux types cellulaires aura dans chacun une localisation subcellulaire précise et ceci grâce à la liaison de protéines différentes. Ce canal, dont les propriétés intrinsèques peuvent être régulées, par des protéines kinases par exemple, est soumis à un second niveau de régulation par l'intermédiaire de protéines d'échafaudage qui lui sont associées et qui contrôlent sa localisation de façon précise, mais qui peuvent également placer à proximité d'autres protéines capables de moduler l'activité du canal. De telles régulations sont essentielles au bon fonctionnement des cellules. Les canaux Kir de par leurs propriétés ont en effet la capacité de modifier le potentiel de membrane et l'excitabilité cellulaire des neurones qui sont souvent un préalable au déclenchement de nombreux processus : voies de signalisation ou encore plasticité synaptique.

Nous avons également pu remarquer que les deux signaux responsables de l'adressage de Kir<sub>2.3</sub> se situent à l'extrémité de sa partie C-terminale. Or ce sont ces séquences qui sont les moins conservées parmi les différentes sous-unités Kir. On peut alors



**Figure 59 : Le canal Kir<sub>5.1</sub> non fonctionnel produit des courants lorsqu'il est co-exprimé avec PSD-95 dans les cellules HEK293.**

A. Courants macroscopiques représentatifs enregistrés dans des cellules exprimant Kir<sub>5.1</sub> seul, PSD-95 seul ou co-exprimant Kir<sub>5.1</sub> et PSD-95. Les cellules sont maintenues à un potentiel de repos de 0mV et les courants sont activés par une dépolarisation de -100mV à +40mV par incréments de 20mV.

B. Courbes voltage/potential de cellules exprimant Kir<sub>5.1</sub>, PSD-95 ou les deux ensemble (modifiée d'après Tanemoto et al., 2002).

imaginer que cette extrémité C-terminale, distincte dans les différentes isoformes permette un adressage différentiel de celles-ci.

Le canal Kir<sub>5.1</sub> interagit également avec des protéines à domaine PDZ. Ce canal n'est pas fonctionnel : lorsqu'il est exprimé seul dans un système d'expression hétérologue, aucun courant ne peut être enregistré et la sous-unité est détectée dans le cytoplasme de ces cellules. Il est en revanche très exprimé dans le cerveau, où il est capable d'interagir avec la protéine à domaine PDZ, PSD-95 (Tanemoto *et al.*, 2002). De façon intéressante, la co-expression de Kir<sub>5.1</sub> avec PSD-95 dans une lignée cellulaire, modifie la localisation de Kir<sub>5.1</sub> qui est alors détectée à la membrane plasmique et qui est capable de générer des courants qui ont les propriétés biophysiques des autres canaux de cette famille. Il est possible que ce canal, que l'on pensait non fonctionnel puisse avoir un rôle dans les densités post-synaptiques des neurones, où il forme des complexes avec PSD-95 (*Figure 59*).

Le canal Kir<sub>4.1</sub> est, comme Kir<sub>2.3</sub>, exprimé à la fois dans le cerveau et notamment dans les cellules gliales, mais aussi dans les cellules épithéliales du tubule distal de rein (Lourdel *et al.*, 2002). Des complexes ont été immunoprécipités à partir de cerveaux de souris, dans lesquels Kir<sub>4.1</sub> est associé à un ensemble de protéines appelé complexe dystrophine-glycoprotéines (Connors *et al.*, 2004). D'autres expériences ont montré que cette interaction se réalise *via* une protéine à domaine PDZ, l' $\alpha$ -syntrophine qui se fixe sur les trois derniers acides aminés de l'extrémité C-terminale de Kir<sub>4.1</sub>. Cette interaction joue un rôle dans la localisation et l'ancrage du canal dans certains sous-domaines des astrocytes. Dans les cellules épithéliales de rein, dans lesquelles Kir<sub>4.1</sub> est localisé au niveau de la membrane basolatérale, c'est une autre protéine à domaine PDZ qui interagit avec le canal. Il s'agit de MAGI-1a (Membrane-Associated Guanylate kinase with Inverted domain structure 1), une protéine d'échafaudage de la membrane basolatérale de ces cellules polarisées (Tanemoto *et al.*, 2008). A l'instar de Kir<sub>2.3</sub>, la localisation de Kir<sub>4.1</sub> dépend de deux signaux. Le premier est un motif di-hydrophobe d'export vers la membrane plasmique. Le second permet la rétention du canal à la membrane basolatérale par l'interaction avec cette protéine à domaine PDZ. Cette interaction est encore une fois dépendante de l'état de phosphorylation d'une sérine située dans le domaine de liaison au domaine PDZ. La phosphorylation de ce résidu interrompt l'interaction avec MAGI-1a et le canal est alors relocalisé dans un compartiment périnucléaire. Cette interaction régule la fonction du canal Kir<sub>4.1</sub> qui, dans ces cellules participe à la régulation de l'homéostasie des fluides.



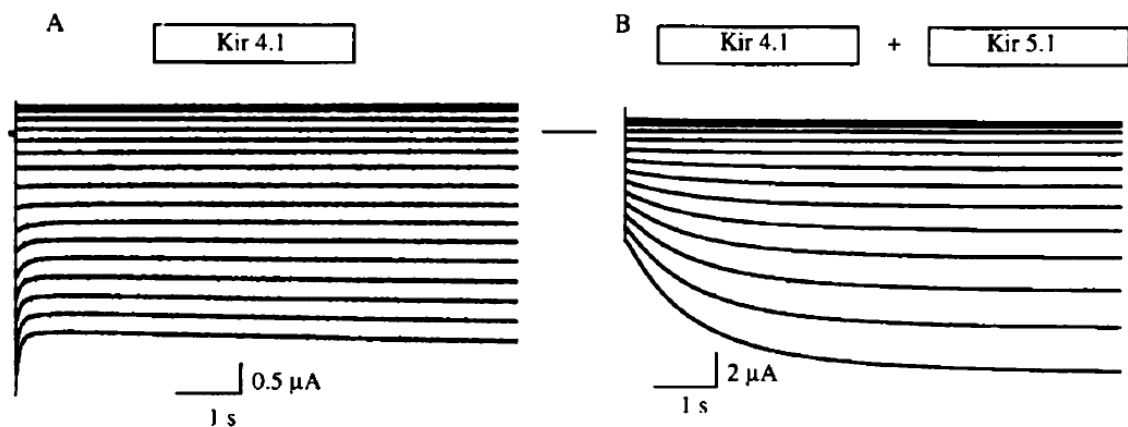
En ce qui concerne Kir<sub>1.1</sub>, deux études contradictoires évoquent une possible phosphorylation du canal par la protéine SGK-1 (Serum and Glucocorticoid inducible Kinase 1) (Yun *et al.*, 2002; Yoo *et al.*, 2004), qui aurait pour conséquence une augmentation des courants macroscopiques Kir<sub>1.1</sub> engendrée par une élévation du nombre de canaux présents à la membrane plasmique. Il se trouve que cette interaction est effectivement possible mais seulement en présence de NHERF-2 (Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>Exchange Regulating Factor 2), une protéine d'échafaudage à domaine PDZ, impliquée dans l'adressage et le trafic à la membrane de certaines protéines de transport. Les trois protéines colocalisent au niveau de la membrane apicale des cellules épithéliales de rein (Yun *et al.*, 2002). Ces cellules expriment, également au niveau de la membrane apicale le canal chlore CFTR dont les mutations sont responsables de la mucoviscidose. Il a été suggéré que CFTR pourrait réguler l'activité de Kir<sub>1.1</sub> (Lu *et al.*, 2006). Effectivement, il existe à la membrane apicale une conductance potassique d'environ 30pS inhibée par une augmentation de la concentration intracellulaire d'ATP et par le gibenclamide. Ces deux propriétés semblent être liées à la présence du CFTR dans ces cellules puisqu'elles ne sont pas observées dans les cellules rénales de souris invalidées pour ce gène. Cette régulation pourrait être médiée par la protéine à domaine PDZ NHERF capable de lier en même temps CFTR et Kir<sub>1.1</sub>. Cette interaction, ainsi que la modulation de Kir<sub>1.1</sub> par le CFTR, sont interrompues par l'activation de la PKA, ce qui a déjà été observé pour d'autres interactions de ce type. Si Kir<sub>1.1</sub> n'est plus lié à NHERF, le canal ne sera plus localisé à la membrane apicale. Physiologiquement, l'association de ces deux canaux, CFTR et Kir<sub>1.1</sub> *via* une même protéine d'échafaudage est une nouvelle forme de régulation d'une conductance potassique (Yoo *et al.*, 2004).

Nous avons vu ici de nombreux exemples d'interaction de sous-unités Kir avec des protéines à domaine PDZ, qui peuvent avoir différentes conséquences sur le canal. Il en existe bien d'autres que je ne détaillerai pas ici.

#### II.2.4 Association de sous-unités Kir

Certaines sous-unités Kir ne sont pas capables, lorsqu'elles s'organisent en tétramères de former un canal fonctionnel. C'est le cas par exemple des sous-unités Kir<sub>3.1</sub> (GIRK<sub>1</sub>), Kir<sub>3.3</sub> ou encore Kir<sub>5.1</sub>. Ces différentes sous-unités ne s'expriment pas à la membrane de la cellule, elles sont retenues dans des compartiments intracellulaires. Il est par conséquent impossible d'enregistrer les courants que ces sous-unités génèrent. Pour certaines, c'est la co-expression avec une autre protéine qui permet une expression correcte du canal à la surface. C'est le cas par exemple pour les sous-unités Kir<sub>6.1</sub> et Kir<sub>6.2</sub> qui





**Figure 60 : Modification des courants Kir<sub>4.1</sub> par la sous-unité Kir<sub>5.1</sub>.**

Courants enregistrés dans des ovocytes de xénope exprimant Kir<sub>4.1</sub> seul (A) ou Kir<sub>4.1</sub> et Kir<sub>5.1</sub> (B). Les courants sont activés par une hyperpolarisation de +40mV à -120mV par incréments de -10mV à partir du potentiel de repos de -10mV (modifiée d'après *Pessia et al.*, 1996).

possèdent toutes deux un motif de rétention dans le réticulum endoplasmique. Elles ont besoin de s'associer avec une autre protéine, un récepteur aux sulfonylurées en l'occurrence. L'interaction entre ces deux sous-unités masque le motif de rétention et permet leur transport vers la membrane plasmique (voir §II.2.1). Dans la famille des canaux Kir, c'est parfois d'autres sous-unités Kir qui jouent ce rôle pour celles qui ne sont pas capables de s'exprimer correctement.

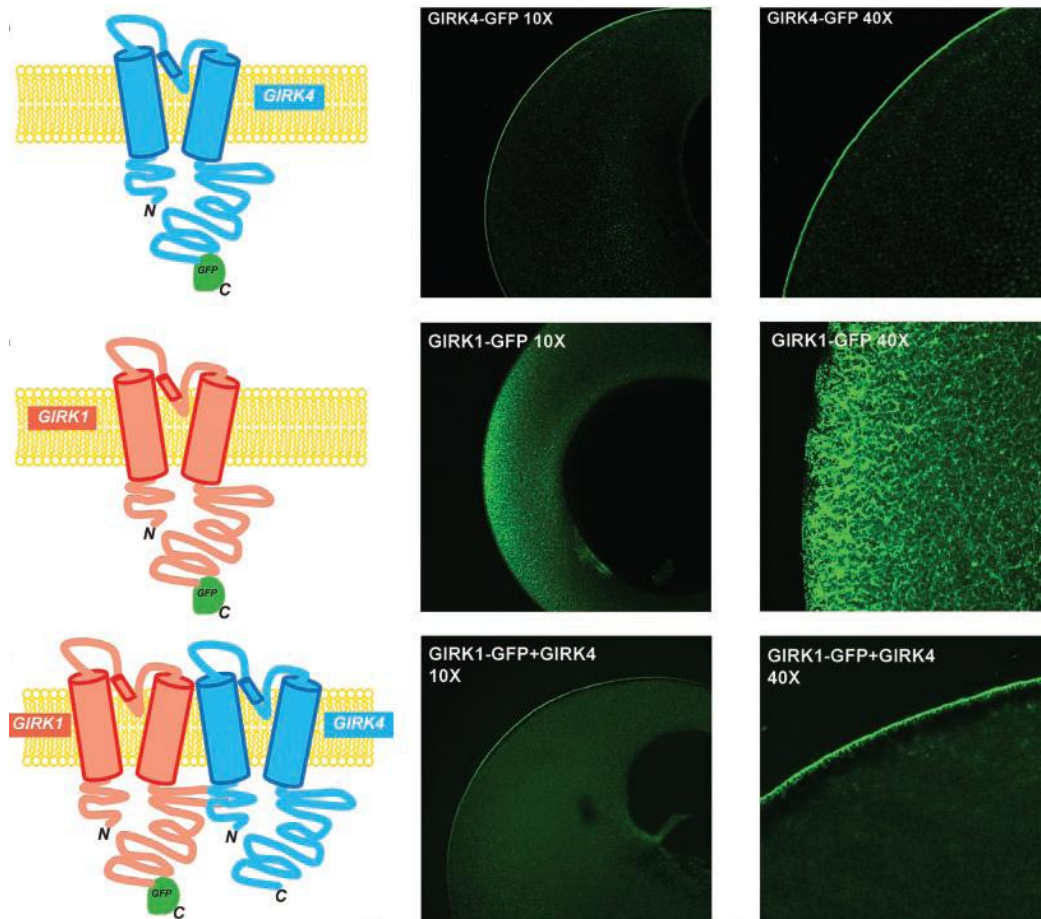
#### a. Cas du canal Kir<sub>5.1</sub>

Cette sous-unité n'est pas capable de former un canal fonctionnel lorsqu'elle est exprimée seule dans un système d'expression hétérologue, elle est retenue dans un compartiment intracellulaire. Elle peut être amenée à la membrane plasmique par une protéine à domaine PDZ, comme nous l'avons vu précédemment, mais l'association avec une autre sous-unité peut avoir le même effet.

En effet, si Kir<sub>4.1</sub>, une sous-unité appartenant à la même sous-famille que Kir<sub>5.1</sub>, est présente dans ces cellules, des hétérotétramères se forment et Kir<sub>4.1</sub> entraîne Kir<sub>5.1</sub> à la membrane basolatérale des cellules polarisées (Pessia *et al.*, 1996). La particularité de cet hétérotétramère est qu'il ne présente plus les mêmes caractéristiques électrophysiologiques que les homotétramères Kir<sub>4.1</sub>. Ce nouveau canal a une conductance unitaire doublée par rapport à celle du canal Kir<sub>4.1</sub>, son ouverture se fait par "burst" alors Kir<sub>4.1</sub> est ouvert presque en continu avec des fermetures très courtes. En plus de cette augmentation des courants macroscopiques, le canal Kir<sub>5.1</sub>/Kir<sub>4.1</sub> présente une rectification entrante plus forte que le canal Kir<sub>4.1</sub> (*Figure 60*). La sensibilité au pH intracellulaire de Kir<sub>4.1</sub> est également modifiée par l'association de Kir<sub>5.1</sub> (Tucker *et al.*, 2000). Kir<sub>4.1</sub> est inhibé à partir d'un pH intracellulaire de 6.0 et augmenté à partir de pH 8.0. En revanche, les canaux Kir<sub>4.1</sub>/Kir<sub>5.1</sub> sont plus sensibles au pH, notamment entre pH 6.0 et 8.0. Entre ces valeurs, les courants des hétérotétramères sont modifiés alors que les courants Kir<sub>4.1</sub> sont complètement stables.

L'existence d'hétérotétramères Kir<sub>4.1</sub>/Kir<sub>5.1</sub> *in vivo* a été démontrée dans les cellules épithéliales des tubules contournés de rein, grâce à des expériences de co-immunoprécipitation. Cela suggère que de tels hétérotétramères existent et que Kir<sub>5.1</sub> peut, par sa capacité à modifier les propriétés de Kir<sub>4.1</sub>, participer à la régulation de la fonction rénale (Tanemoto *et al.*, 2000).

Récemment, il a été montré que Kir<sub>4.2</sub>, exprimé dans le système nerveux central, est également capable d'interagir avec le canal Kir<sub>5.1</sub>.



**Figure 61 : GIRK<sub>4</sub> (Kir<sub>3.4</sub>) s'associe à GIRK<sub>1</sub> (Kir<sub>3.1</sub>) et permet son adressage à la membrane plasmique dans les ovocytes de xénope.**

GIRK<sub>4</sub> exprimé seul est localisé à la membrane plasmique tandis que GIRK<sub>1</sub> est retrouvé dans le cytoplasme. Dans les ovocytes qui expriment les deux sous-unités, GIRK<sub>1</sub> est localisé à la membrane plasmique (modifiée d'après *Mirshahi et al.*, 2004).

### b. Cas du canal Kir<sub>3.1</sub>

Le canal Kir<sub>3.1</sub> (ou GIRK<sub>1</sub>) s'associe avec Kir<sub>3.4</sub> (ou GIRK<sub>4</sub>) dans les myocytes cardiaques pour donner naissance au courant I<sub>K<sub>ACH</sub> sensible aux protéines G. Lorsque Kir<sub>3.1</sub> est exprimé seul dans un système d'expression hétérologue, il est retenu dans le réticulum endoplasmique et n'est pas capable de générer des courants, contrairement à Kir<sub>3.4</sub>, qui est lui exprimé à la surface des cellules (Kennedy *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 2002). Cependant, les courants résultant d'homotétramères Kir<sub>3.4</sub> sont atypiques, ils sont sensibles au dimère G<sub>βγ</sub> et présentent une rectification entrante mais ont une amplitude beaucoup plus faible que I<sub>K<sub>ACH</sub>.</sub></sub>

L'apport de chacune des sous-unités dans le courant I<sub>K<sub>ACH</sub> peut également être observé dans les myocytes isolés à partir de souris invalidées pour le gène Kir<sub>3.4</sub> qui expriment seulement Kir<sub>3.1</sub>. Dans ces cellules aucun courant de type I<sub>K<sub>ACH</sub> n'est enregistré (Wickman *et al.*, 1998).</sub></sub>

Les sous-unités Kir<sub>3.1</sub> et Kir<sub>3.4</sub> doivent former des hétérotétramères pour produire le courant I<sub>K<sub>ACH</sub> que l'on connaît : Kir<sub>3.4</sub> permettant la localisation correcte de Kir<sub>3.1</sub> à la membrane plasmique et Kir<sub>3.1</sub> apportant des modifications électrophysiologiques, ou encore des sites de régulation par des protéines kinases par exemple. Kir<sub>3.4</sub> exerce ses effets sur l'adressage de l'hétérotétramère très tôt puisque la liaison de ces deux sous-unités se fait pendant, ou juste après la synthèse des protéines (*Figure 61*) (Mirshahi and Logothetis, 2004).</sub>

Kir<sub>3.2</sub> permet également la localisation de Kir<sub>3.1</sub> à la membrane plasmique. Cet hétérotétramère est retrouvé dans les neurones du cortex et de l'hippocampe. Kir<sub>3.2</sub> et Kir<sub>3.4</sub> sont exprimés correctement à la membrane plasmique grâce à deux signaux antérogrades (Ma *et al.*, 2002). L'un est un cluster de résidus acides qui est un signal d'export du réticulum endoplasmique, situé dans l'extrémité N-terminale du canal. Le second est un signal post-Golgi d'adressage à la surface situé dans l'extrémité C-terminale, qui permet le transport des endosomes vers la membrane plasmique. Quant à Kir<sub>3.1</sub>, il ne possède pas de signal d'export du réticulum endoplasmique, expliquant sa rétention dans ce compartiment (Mirshahi and Logothetis, 2004).

Ces deux signaux sont présents dans la sous-unité Kir<sub>3.2</sub>. Cependant son expression à la surface plasmique n'est pas totale, une partie des protéines est retenue dans les endosomes. La sous-unité Kir<sub>3.2</sub> possède dans son cluster de résidus acides un site de phosphorylation. La phosphorylation ou non de ce résidu semble commander la localisation



du canal Kir<sub>3.2</sub>, à la membrane ou dans les endosomes, permettant alors une régulation fine et très rapide de l'excitabilité des cellules.

Récemment, Chung *et al.* ont montré que l'activation des récepteurs NMDA dans les neurones d'hippocampe entraîne une augmentation du nombre de canaux Kir<sub>3.2</sub> à la membrane plasmique (Chung *et al.*, 2009; Chung *et al.*, 2009b). Cette augmentation fait intervenir la protéine phosphatase 1 (PP1) qui, en dé-phosphorylant un ou plusieurs résidus de Kir<sub>3.2</sub>, entraîne alors leur sortie des endosomes où ils sont retenus. Cet effet est relayé par les récepteurs adénosine A1. Toutes ces protéines (A1, PP1 et NMDAR) sont impliquées dans une forme de plasticité synaptique connue des neurones d'hippocampe, et dont Kir<sub>3.1</sub> et Kir<sub>3.2</sub> pourraient alors être en partie responsable. Il s'agit de la dépotentiation qui est une dépression de l'activité synaptique intervenant après un protocole particulier (LFS) si une LTP (Long-Term Potentiation, autre forme de plasticité synaptique) a été préalablement induite dans ces cellules. Ce groupe a fait l'hypothèse que l'augmentation du nombre de canaux Kir<sub>3.2</sub> à la surface des cellules entraîne une diminution de l'excitabilité membranaire au niveau des épines dendritiques, mais pas dans le corps cellulaire ou l'axone où Kir<sub>3.2</sub> n'est pas présent, ce qui serait à l'origine de la dépression de l'activité synaptique enregistrée. Cette même expérience a été réalisée chez des souris invalidées pour le canal Kir<sub>3.2</sub>, ou sur des cellules traitées avec un bloqueur de cette sous-unité. Dans les deux cas, aucune dépotentiation n'est observée. La fine régulation de l'adressage de Kir<sub>3.2</sub>, et dans son sillage Kir<sub>3.1</sub>, entre un compartiment cellulaire et la membrane plasmique semble donc jouer un rôle déterminant dans la mise en place d'une forme de plasticité synaptique. Il faut noter que la plasticité synaptique est considérée comme le corrélat cellulaire des phénomènes de mémorisation. De plus, la régulation de Kir<sub>3.2</sub> par l'activité neuronale *via* les récepteurs NMDA pourrait avoir de nombreuses conséquences dans des situations physiopathologiques, dans lesquelles Kir<sub>3.2</sub> est impliqué, notamment d'épilepsies ou de réponses à la douleur.

### c. Cas du canal Kir3.3

Lorsque Kir<sub>3.3</sub> est exprimé seul dans un système d'expression hétérologue, il est également retenu dans le réticulum endoplasmique et ne s'exprime pas à la surface des cellules (Ma *et al.*, 2002). C'est le seul canal de cette sous-famille qui ne permet pas l'expression de Kir<sub>3.1</sub> à la membrane plasmique. Comme Kir<sub>3.1</sub>, Kir<sub>3.3</sub> ne possède pas de motif d'export du réticulum endoplasmique (Lesage *et al.*, 1995). Donc quand il est exprimé seul, il est retenu dans ce compartiment. Ce qui est surprenant avec ce canal, c'est que la co-expression de Kir<sub>3.2</sub> ou Kir<sub>3.4</sub>, ou encore l'ajout d'un motif d'export du réticulum à sa séquence ne permet pas sa localisation à la membrane. De plus, il diminue l'expression des



autres sous-unités avec lesquelles il forme des hétérotétramères (Kofuji *et al.*, 1995). Il a été montré que, outre le manque d'un signal d'export du réticulum, cette sous-unité possède un motif de type YXX $\phi$  dans son extrémité C-terminale, qui est un signal d'internalisation et de transport vers les lysosomes. Il semble donc que le canal Kir<sub>3.3</sub> ait besoin de s'associer à Kir<sub>3.2</sub> ou Kir<sub>3.4</sub> pour sortir du réticulum, mais cet hétérotétramère est ensuite dirigé vers le lysosome grâce à ce motif présent sur Kir<sub>3.3</sub>. Une fois encore, cette particularité peut permettre une régulation fine de l'excitabilité membranaire, dans un type cellulaire ou une structure précise par exemple (Schoots *et al.*, 1999).

### II.2.5 Autres protéines partenaires

Dans un premier temps, il n'avait été démontré aucun effet de la PKA sur l'activité des canaux Kir<sub>2.1</sub> et Kir<sub>2.2</sub>. Mais une interaction entre ces sous-unités et la protéine d'échafaudage AKAP-79 (A-Kinase Anchoring Protein 79) a été identifiée (Dart and Leyland, 2001) (Hayabuchi *et al.*, 2001). Les protéines de la famille des AKAP ont la particularité de pouvoir lier différentes protéines, dont la PKA. De façon intéressante, les courants Kir<sub>2.1</sub> et Kir<sub>2.2</sub> sont modulés par la PKA lorsque le canal est co-exprimé avec AKAP-79 dans un système d'expression hétérologue. Les protéines AKAP permettent de placer à proximité la PKA et sa protéine effectrice, lui permettant alors de cibler son action, qui, en l'absence de la protéine d'échafaudage est quasiment nulle. Physiologiquement, la phosphorylation de ces canaux et ses conséquences pourraient être impliquées dans la réponse à l'activation de récepteurs membranaires, aux neurotransmetteurs notamment. L'activation des canaux Kir peut effectivement permettre de modifier l'excitabilité cellulaire, en abaissant le potentiel membranaire, étape importante dans certaines formes de plasticité synaptique.

Nous voyons ici que les canaux à deux domaines transmembranaires et une boucle P interagissent avec une grande diversité de protéines partenaires : des protéines à domaine PDZ, des protéines d'échafaudage, des protéines G, d'autres canaux ioniques ou encore des récepteurs transmembranaires, comme les récepteurs aux sulphonylurés. Cependant de nouvelles interactions et leurs implications physiologiques sont régulièrement identifiées.





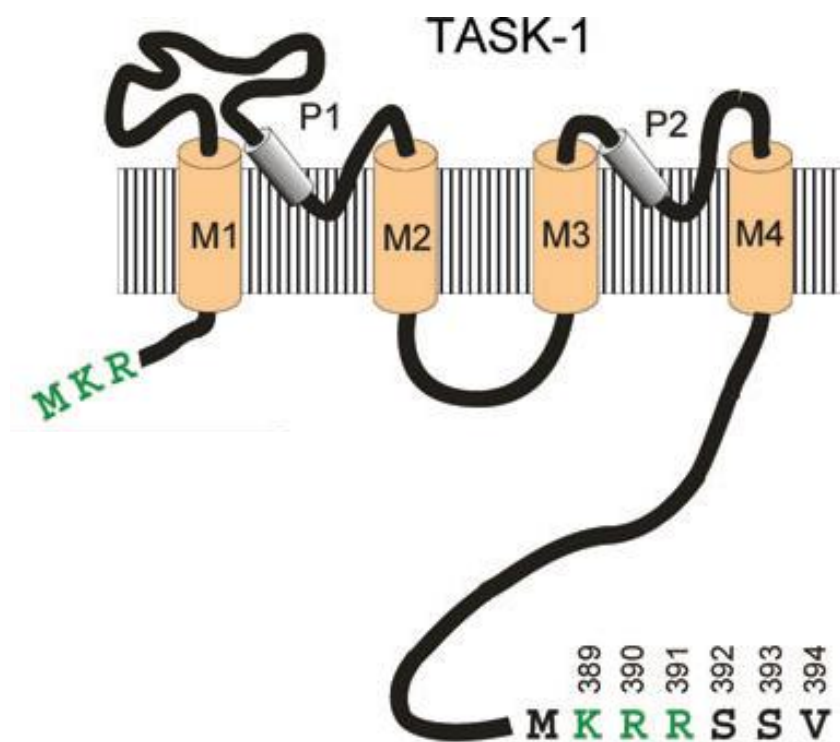
## II.3 LES PROTEINES ASSOCIEES AUX CANAUX POTASSIQUES A DEUX DOMAINES P

Les sous-unités appartenant à la famille des canaux potassiques à deux domaines P et quatre segments transmembranaires génèrent les courants que l'on appelle courants de fuite ou de fond, qui participent principalement à l'établissement et au maintien du potentiel de membrane. Cette famille est celle qui a été le plus récemment découverte. Certaines de ces sous-unités ne génèrent pas de courant quand elles sont exprimées dans des systèmes d'expression hétérologue. Dans la plupart des cas, les sous-unités non fonctionnelles ne produisent pas de courant parce qu'elles sont retenues dans un compartiment intracellulaire. L'interaction de protéines associées, comme cela est le cas pour certains membres des autres familles de canaux potassiques, pourrait permettre l'adressage à la membrane de ces canaux. L'identification et l'étude d'éventuelles protéines associées aux membres de cette famille est relativement récente et loin d'être terminée. Le premier membre pour lequel une protéine associée a été découverte est le canal TASK1. Depuis d'autres protéines ont été identifiées (pour revue (Enyedi and Czirjak)).

### II.3.1 Les protéines associées aux canaux TASK

La délétion des trois derniers acides aminés de l'extrémité C-terminale (SSV) du canal TASK1 entraîne une rétention du canal dans le réticulum endoplasmique. L'interaction d'une protéine sur ce motif particulier a été démontrée par des expériences de double hybride chez la levure (Rajan *et al.*, 2002). La protéine 14.3.3 a ainsi été identifiée, elle interagit avec TASK1 au niveau des trois derniers résidus de l'extrémité C-terminale de la sous-unité canal (O'Kelly *et al.*, 2002). Cette interaction est dépendante de la phosphorylation d'une sérine de ce motif, et permet l'adressage du canal au niveau de la membrane plasmique. Si TASK1 n'est pas associé à 14.3.3, le canal est alors retenu dans le réticulum endoplasmique.

Les protéines 14.3.3 comptent sept isoformes codées par sept gènes différents chez les mammifères, elles sont présentes de façons ubiquitaires, en grande quantité dans le cerveau notamment (Tzivion *et al.*, 2001). Ce sont de petites protéines cytosoliques de 30kDa, acides sans aucune activité enzymatique connue. Il existe trois motifs consensus permettant la liaison de 14.3.3 sur une protéine partenaire : les "modes I et II" contiennent une proline et peuvent se situer n'importe où sur le domaine cytoplasmique d'une protéine, le "mode III" ne contient pas de proline mais ces motifs sont toujours situés à l'extrémité C-terminale de la protéine cible, comme cela est le cas pour TASK1. Les protéines 14.3.3 sont impliquées dans un grand nombre de processus cellulaires, comme la régulation de



**Figure 62 : Schéma représentant la topologie du canal TASK1.**

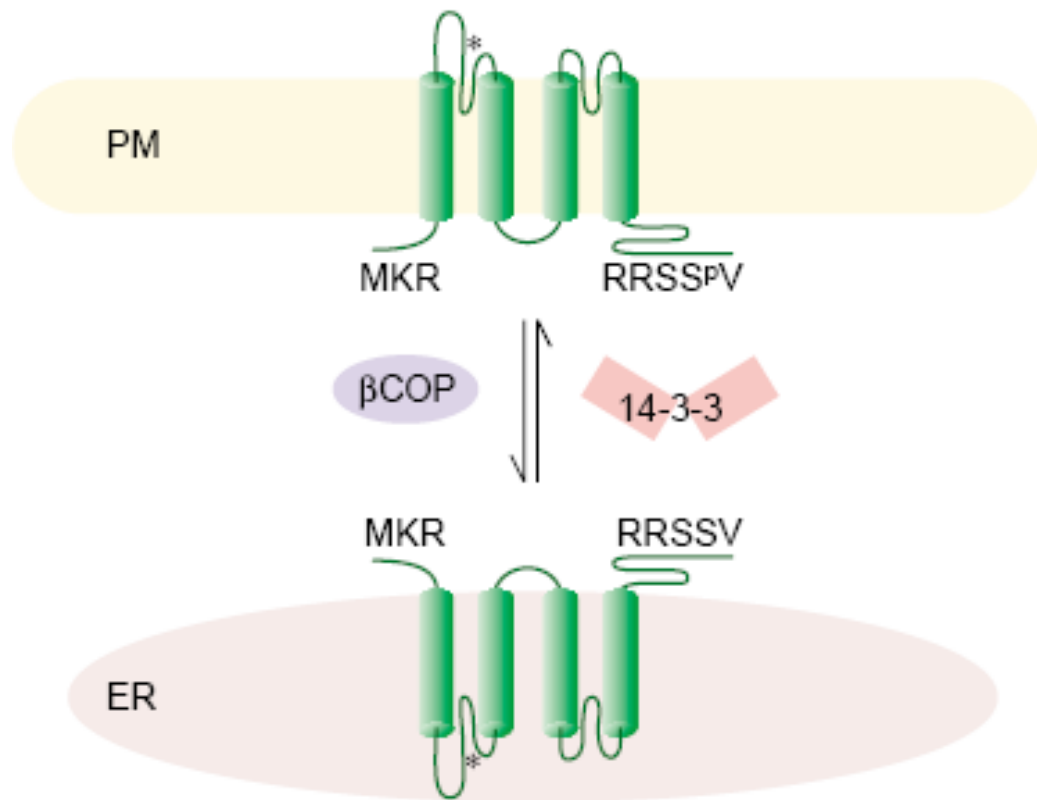
TASK1 possède deux motifs de signalisation, en vert sur le schéma (modifiée d'après *Zuzarte et al.*, 2009).

protéines kinases, le contrôle du cycle cellulaire, l'apoptose, le transfert de signaux entre le noyau et le cytosol, et désormais dans le trafic intracellulaire de protéines membranaires telles que le canal TASK.

L'interaction de 14.3.3 ne se limite pas au canal TASK1 puisque toutes les isoformes de 14.3.3 sont capables de lier les canaux de la sous-famille, c'est-à-dire TASK1, TASK3 et TASK5. Le canal TASK5 est, comme nous l'avons vu précédemment non fonctionnel lorsqu'il est exprimé dans un système d'expression hétérologue. Cependant, la liaison de la protéine 14.3.3 ne suffit pas à permettre une localisation membranaire de ce canal.

La rétention dans le réticulum endoplasmique de canaux non-liés à 14.3.3 est favorisée par la fixation d'autres protéines associées. Deux signaux de rétention basiques ont été reconnus dans le canal TASK1, le premier se situe à l'extrémité N-terminale et le second à l'extrémité C-terminale (O'Kelly and Goldstein, 2008). Ces deux sites sont capables d'interagir avec  $\beta$ -COP, une sous-unité du complexe protéique nommé coatomer COP-1, qui se trouve à la surface des vésicules de transport intervenant dans les premiers stades du processus de sécrétion de protéines, depuis le Golgi vers le réticulum endoplasmique. Les protéines qui viennent d'être synthétisées et qui sont destinées à la membrane plasmique se replient dans le réticulum endoplasmique et passent ensuite à travers le Golgi avant de rejoindre le compartiment membranaire. Si ces protéines sont mal repliées ou si elles sont destinées à rester dans le réticulum endoplasmique, elles en sortent mais sont très vite neutralisées dans les vésicules recouvertes de protéines COP-1 pour un transport rétrograde vers le réticulum. Les protéines COP-1 agissent de manière spécifique grâce à la reconnaissance d'un domaine dibasique cytoplasmique présent sur les protéines cibles, ce qui est le cas des canaux TASK qui en possèdent deux. COP-1 est donc capable d'interagir avec les deux domaines basiques des sous-unités TASK afin de maintenir celles-ci dans le réticulum endoplasmique. Si l'un des deux domaines d'interaction est muté, l'interaction de haute affinité entre TASK et COP-1 est perdue et le canal peut alors rejoindre la membrane plasmique et générer des courants. Ce dernier point reste toutefois controversé. Une étude récente montre que le motif basique situé en N-terminal n'est pas nécessaire à la rétention du canal dans le réticulum endoplasmique. Le motif situé à l'extrémité C-terminale serait alors dominant, et l'interaction de 14.3.3, qui masque celui-ci, permet l'adressage du canal à la membrane plasmique (Zuzarte *et al.*, 2007).

Des expériences d'interactions *in vitro* ont montré que la liaison de COP-1 et 14.3.3 sur les canaux TASK sont mutuellement exclusives. Les deux protéines ne peuvent pas se fixer en même temps sur la sous-unité canal. Le motif KRR de liaison au coatomer se situe immédiatement en amont du domaine d'interaction de 14.3.3 au niveau de l'extrémité C-terminale (Figure 62). C'est donc la fixation phosphorylation-dépendante de la protéine



**Figure 63 : La localisation des canaux TASK1 et TASK3 dépend de l'interaction de deux protéines  $\beta$ COP et 14-3-3.**

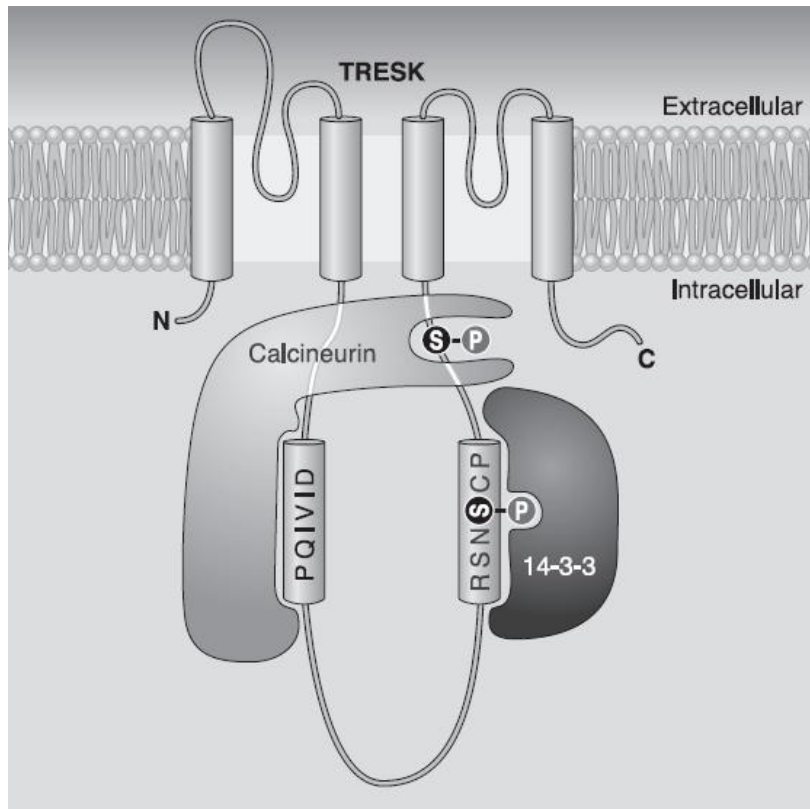
TASK1 et TASK3 sont retenus dans le réticulum endoplasmique (ER) par la liaison de  $\beta$ COP. La phosphorylation d'un résidu à l'extrémité C-terminale permet la liaison de la protéine 14-3-3 inhibant l'interaction du canal avec  $\beta$ COP. Cela entraîne la localisation du canal à la membrane plasmique (PM) (modifiée d'après *Plant et al.*, 2005).

14.3.3 qui permet de mettre fin à l'interaction du canal avec COP-1. Le canal n'est alors plus retenu dans le réticulum endoplasmique et peut s'insérer dans la membrane plasmique. C'est donc cette interaction qui constitue le signal "d'expédition" du canal vers la membrane plasmique (*Figure 63*). Cependant la protéine 14.3.3 ne joue pas de rôle dans la dimérisation du canal, comme cela avait été suggéré dans un premier temps (Zuzarte *et al.*, 2009).

L'interaction du canal TASK1 avec la protéine p11 a dans un premier temps été caractérisée à partir d'expériences de double hybride chez la levure (Girard *et al.*, 2002). Le site d'interaction avait été identifié sur les trois derniers résidus de l'extrémité C-terminale du canal. Les auteurs ont montré que cette interaction avait pour effet une augmentation du nombre de canaux TASK1 à la membrane plasmique. La protéine p11 appartient à la famille des protéines S100, qui est une famille multigénique de protéines capables de lier le calcium (Rescher and Gerke, 2008). P11 existe sous forme de dimère et est souvent associée au complexe Annexine II. P11 et plus généralement le complexe Annexine ont été impliqués dans la régulation de l'organisation membranaire, la liaison de la membrane au cytosquelette, ainsi que dans les processus d'exocytose et d'endocytose.

Plus tard, il a été démontré que p11 interagit avec le canal seulement en présence de la protéine 14.3.3 (Renigunta *et al.*, 2006). De plus le site d'interaction de p11 ne se situe pas au niveau des trois derniers résidus de l'extrémité C-terminale du canal, mais sur un domaine plus vaste d'une vingtaine d'acides aminés situé au début de l'extrémité C-terminale. Enfin, l'interaction de p11 sur le canal TASK1 semble responsable, non pas d'une augmentation du nombre de canaux à la surface de la cellule, mais d'une rétention du canal dans le réticulum endoplasmique et donc d'une diminution des courants macroscopiques enregistrés. L'hypothèse qui a été faite est que la première expérience qui a permis d'identifier p11 dans les levures était contaminée par la protéine, très ubiquitaire et présente chez la levure, 14.3.3. Celle-ci est passée inaperçue mais a faussé l'interprétation des résultats obtenus.

Il est tout de même acquis que les canaux TASK1 et TASK3 possèdent deux signaux de rétention dans le réticulum endoplasmique *via* l'interaction avec la protéine du manteau  $\beta$ -COP. Leur fonctionnement coordonné ou indépendant reste à déterminer. Ces signaux rétrogrades sont masqués et la liaison de  $\beta$ -COP est inhibée par la fixation phosphorylation-dépendante de la protéine 14.3.3. Cette association permet la libération de la sous-unité canal du réticulum endoplasmique où elle était retenue et son insertion dans la membrane plasmique. La liaison de p11 semble capable de moduler cette interaction dans les cellules où celle-ci est présente avec le canal. Ce dernier point demande toutefois de nouvelles études pour une meilleure compréhension du rôle de p11.



**Figure 64 : Représentation schématique des différentes protéines partenaires interagissant directement avec le canal TRESK.**

La calcineurine interagit directement et de façon calcium dépendante avec un motif NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells) de TRESK. La déphosphorylation de la sérine en position 276 par la calcineurine est le principal mécanisme activateur du canal. L'association de la protéine ubiquitaire 14-3-3 est dépendante de la phosphorylation d'un résidu situé dans le domaine d'interaction (d'après *Enyedi et al.*, 2010).

### II.3.2 Le canal TRESK et ses protéines associées

Le canal TRESK, qui est l'unique membre de sa sous-famille est capable d'interagir avec deux protéines simultanément : 14.3.3 et la calcineurine qui jouent un rôle sur les propriétés biophysiques du canal, mais qui ne sont pas impliquées dans l'adressage de celui-ci à la membrane plasmique (Czirjak *et al.*, 2004) (Czirjak *et al.*, 2008).

Le canal TRESK, lorsqu'il est exprimé dans des ovocytes de xénope a la particularité d'être très fortement activé par le calcium (Kang and Kim, 2006). Une élévation de la concentration intracellulaire de calcium est d'ailleurs nécessaire à l'activation de ces canaux. L'effet du calcium sur le canal est perdu lorsque les enregistrements sont réalisés en configuration inside-out, c'est-à-dire que la face interne du canal n'est plus en contact avec le cytoplasme de la cellule. Ceci implique que l'activation par le calcium n'est pas directe comme cela est le cas pour les canaux potassiques de type BK ou SK, mais qu'elle nécessite un intermédiaire. Cet intermédiaire est en fait la protéine phosphatase dépendant du calcium, la calcineurine. La sérine située en position 276 est le résidu cible de cette phosphatase, puisque lorsque cette sérine est déphosphorylée, le canal est activé. L'interaction, de très haute affinité entre la calcineurine et TRESK est directe et se réalise au niveau d'un domaine similaire aux domaines NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells) situé au niveau de la boucle M<sub>2</sub>-M<sub>3</sub> du canal (Czirjak and Enyedi, 2006).

Le canal TRESK possède également au niveau de cette boucle M<sub>2</sub>-M<sub>3</sub> un site d'interaction pour la protéine 14.3.3. Ce motif est caractérisé de mode I car il contient une proline et qu'il n'est pas situé au niveau de l'extrémité C-terminale de la protéine cible. Ce motif contient une sérine (S264) qui doit être phosphorylée par la PKA pour que 14.3.3 puisse s'associer au canal. Le motif d'interaction de 14.3.3 se situe entre le site d'interaction de la calcineurine sur le canal et son résidu cible, la sérine 276 (Czirjak *et al.*, 2008) (*Figure 64*).

La déphosphorylation du résidu S276 active les courants TRESK, et la protéine 14.3.3, lorsqu'elle est également associée au canal a pour conséquence de ralentir la rephosphorylation de ce résidu à la suite de l'activation de la calcineurine, qui est elle-même activée par une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium. Le retour du canal à un état inactif est donc retardé par la fixation de 14.3.3.

Ces interactions n'ont pas été démontrées *in vivo* à ce jour, mais elles pourraient permettre de coupler la signalisation calcique au potentiel de repos membranaire de la cellule, et en particulier, une élévation de la concentration intracellulaire de calcium, qui





active les courants TRESK, serait responsable d'une hyperpolarisation de la cellule et d'une baisse de l'excitabilité membranaire.

### II.3.3 Le canal TWIK1 et ses protéines associées

Deux hypothèses se sont opposées pour expliquer l'absence de courants générés par le canal TWIK lorsque celui-ci est exprimé dans un système d'expression hétérologue.

La première hypothèse repose sur le fait que le canal est localisé dans un compartiment intracellulaire très proche de la membrane plasmique dans les cellules épithéliales polarisées (Decressac *et al.*, 2004). Le transfert du canal à la membrane serait régulé de façon très précise par l'interaction d'une protéine. La recherche de protéines partenaires par la technique de double hybride a permis d'identifier une protéine : EFA6, qui est un facteur d'échange pour la petite protéine G ADP-ribosylation factor 6 (ARF6). L'interaction entre TWIK1 et EFA6 est dépendante d'ARF6, qui est connue pour participer au recyclage de la membrane plasmique, à l'organisation du cytosquelette d'actine ou encore au trafic intracellulaire de vésicules. Le complexe EFA6/ARF6 pourrait être responsable de la séquestration du canal dans ce compartiment de recyclage subapical. Cependant une expression fonctionnelle du canal TWIK à la membrane plasmique de systèmes d'expression hétérologue n'a jamais été démontrée malgré les tentatives réalisées avec différentes formes du système EFA6/ARF6.

Selon la seconde hypothèse, TWIK1 est en permanence inséré dans la membrane plasmique. Son activité est inhibée par une modification post-traductionnelle, une sumoylation, en l'occurrence, qui fait intervenir la liaison d'une protéine de la famille SUMO de façon réversible et covalente sur le canal (Rajan *et al.*, 2005). Cette interaction se fait sur une lysine et la rupture de cette interaction déclencherait l'activation du canal TWIK. Cette seconde hypothèse reste toutefois très controversée puisque la démonstration d'une sumoylation du canal TWIK n'a jamais pu être démontrée au laboratoire (Felicangeli *et al.*, 2007).

Le canal KCNK7 appartient à la même sous-famille que le canal TWIK. Dans les systèmes d'expression hétérologue, il n'est pas fonctionnel car il est retenu dans un compartiment intracellulaire. Aucune protéine pouvant permettre l'insertion de ce canal dans la membrane plasmique n'a été à ce jour identifiée.



### II.3.4 Les protéines associées aux canaux TREK

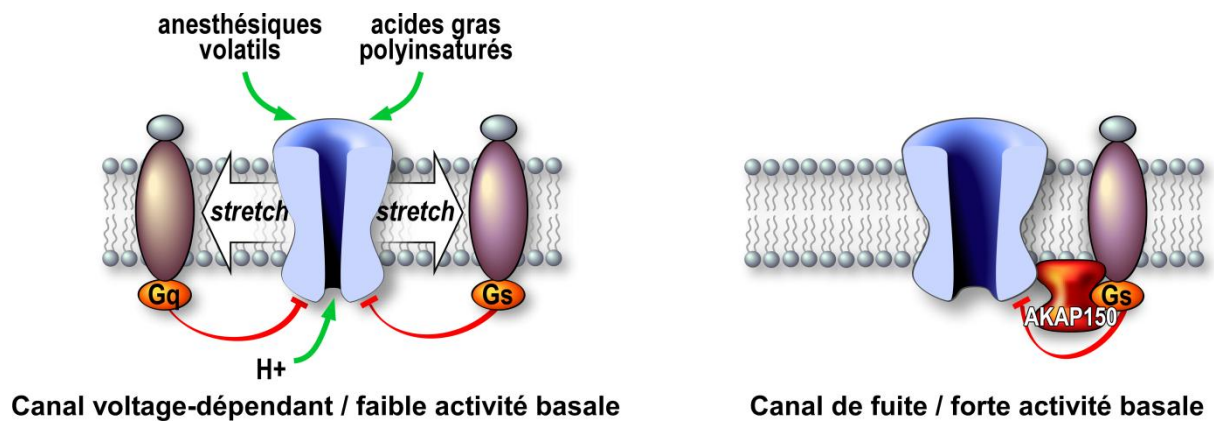
#### a. Interaction de TREK1 avec la protéine d'échafaudage AKAP-150

Les canaux TREK1 sont régulés par un très grand nombre de stimuli physiques, chimiques mais aussi pharmacologiques. L'hypothèse qui a été faite par le laboratoire il y a quelques années est que TREK1 pourrait également être régulé par des protéines qui lui seraient associées et qui modifieraient alors ses propriétés biophysiques. Cette hypothèse a été vérifiée par une approche protéomique (voir §III.1). Cette expérience a permis d'identifier un certain nombre de partenaires potentiels du canal TREK1.

L'une d'entre elles est l'AKAP-150 (Sandoz *et al.*, 2006). C'est une protéine d'échafaudage connue pour son rôle dans l'organisation de complexes de signalisation dans les neurones (Colledge and Scott, 1999). AKAP-150 interagit avec la PKA, la PKC, la protéine phosphatase 2B, des récepteurs membranaires, des canaux ioniques, mais aussi des protéines post-synaptiques, telles que PSD95 et SAP97. La liaison de la sous-unité canal avec cette protéine d'échafaudage a été démontrée *in vitro* et *in vivo*. Par ailleurs, elle existe aussi pour le canal TREK2, une autre sous-unité de cette sous-famille.

Le site de cette interaction est un cluster de charges positives, impliqué dans de nombreuses autres régulations du canal TREK1, situé dans la partie C-terminale du canal, après le segment M<sub>4</sub>. L'association d'AKAP-150 avec TREK1 entraîne une augmentation drastique des courants. De plus, les régulations du canal qui mettent en jeu ce cluster de charges, telles que l'activation par l'acide arachidonique ou la sensibilité à l'étirement membranaire, sont perdues lorsqu'AKAP-150 est fixée sur le canal. La liaison de cette protéine d'échafaudage aux canaux TREK augmentent donc fortement les courants générés par ces sous-unités mais modifie surtout leurs propriétés biophysiques. Effectivement, ces canaux qui sont normalement peu actifs et dont l'ouverture est régulée par de nombreux stimuli deviennent, grâce à cette interaction des canaux de fuite très actifs et très peu régulés.

Le rôle de protéines d'échafaudage telles qu'AKAP-150 est de placer à proximité dans la cellule deux protéines, l'une effectrice, par exemple une kinase, l'autre est alors l'effecteur, et est régulée par cette kinase. Dans le cas de TREK1, ce rôle est très bien démontré par l'activation de récepteurs couplés aux protéines Gs. Les courants TREK sont inhibés par l'activation de tels récepteurs, *via* l'augmentation du taux d'AMPc intracellulaire et l'activation de la PKA. Lorsqu'AKAP-150 est liée à TREK, son inhibition est beaucoup plus rapide suggérant que l'ancrage de PKA à TREK1 par l'intermédiaire d'AKAP-150 est essentiel pour un effet rapide et spécifique des récepteurs couplés aux protéines Gs notamment.



**Figure 65 : Schéma représentant les effets de la liaison de la protéine d'échafaudage AKAP-150 sur les canaux TREK (au centre, en bleu-violet).**

AKAP-150 transforme le canal TREK, voltage-dépendant, stimulé par l'acide arachidonique, le pH et l'étirement membranaire (à gauche) en un canal de fuite, qui n'est plus régulé par les récepteurs couplés aux protéines G<sub>q</sub> (à droite). Il est toujours inhibé et de façon plus efficace grâce à AKAP-150 par les récepteurs couplés aux protéines G<sub>s</sub> (modifiée d'après *Sandoz et al.*, 2006).

AKAP-150 n'a pas une distribution uniforme dans les neurones et de tels complexes, AKAP-150/TREK, sont attendus dans les boutons synaptiques. Les canaux TREK semblent donc avoir deux modes de fonctionnement, le premier est un canal peu actif et très régulé lorsqu'il est seul, et le second, lorsqu'il est lié à AKAP-150 est un canal à forte conductance peu régulé, pouvant alors jouer un rôle important dans l'excitabilité cellulaire locale des compartiments qui l'expriment (*Figure 65*).

Au cours de ma thèse, j'ai participé à l'étude d'une seconde protéine, identifiée par cette approche protéomique, et qui s'est avérée être un autre partenaire de TREK1. Cette étude sera présentée dans la partie "Résultats : Article 1".

#### b. Interaction de TREK1 et la protéine prion PrP<sup>C</sup>

Une interaction entre le canal TREK1 et la protéine prion cellulaire PrP<sup>C</sup> a été montrée grâce à une expérience de double hybride chez la bactérie (Azzalin *et al.*, 2006). La protéine PrP<sup>C</sup> est très conservée chez les mammifères. Son rôle physiologique n'est pas encore bien compris, par contre on sait que dans certaines conditions pathologiques, PrP<sup>C</sup> est modifiée, ses propriétés changent et elle devient alors PrP<sup>Sc</sup> (Protéine Prion Scrapie), impliquée dans les encéphalites spongiformes transmissibles. L'interaction entre TREK1 et PrP<sup>C</sup> a été vérifiée par des expériences d'immunohistochimie, sur des lignées cellulaires transfectées et sur des tranches de cervelet. Dans les deux cas, les deux protéines semblent être colocalisées. Cependant jusqu'à présent aucun effet fonctionnel de cette association n'a été démontré.

#### c. Interaction de TREK1 avec un peptide dérivé du récepteur à la neurotensine

Très récemment une association surprenante a été identifiée entre le canal TREK1 et non pas une protéine mais un peptide, nommé spadin (Mazella *et al.*). Ce peptide est issu du clivage du récepteur à la neurotensine NTSR3, aussi appelé sortiline. Ce récepteur est produit sous la forme d'un précurseur dont un peptide, de 44 acides aminés, est clivé par la furine au cours de son transport dans les vésicules (Mazella *et al.*, 1998). Le récepteur NTSR3 est une protéine membranaire d'environ 100kDa, formée d'un segment transmembranaire, d'une courte extrémité C-terminale et d'une longue extrémité N-terminale qui est orientée vers la lumière d'une vésicule, ou à l'extérieur de la cellule si le récepteur est inséré dans la membrane plasmique. Une grande proportion des protéines NTSR3 sont retrouvées dans l'appareil de Golgi où elles jouent un rôle intracellulaire dans le trafic et l'adressage d'autres protéines. En fonction des conditions physiologiques, ce récepteur peut aussi s'insérer dans la membrane plasmique de la cellule, où il joue d'autres rôles, notamment de récepteurs à la



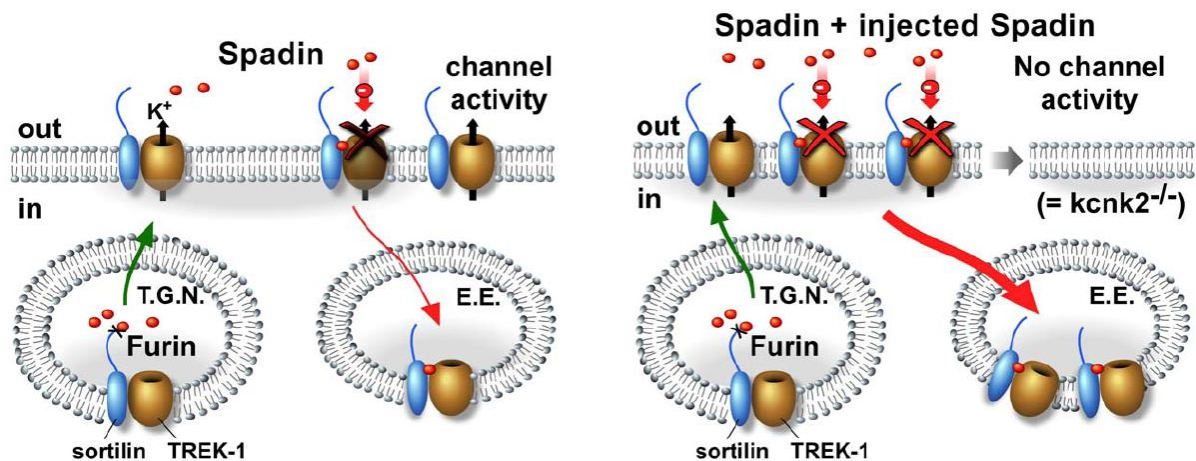
neurotensine ou au précurseur du NGF (Nerve Growth Factor). Le récepteur NTR3 est essentiel par exemple à l'induction de la mort neuronale par le proNGF. Il est également inhibé par le propeptide de 44 acides aminés libéré lors de sa maturation, qui empêche d'autres ligands d'interagir avec le récepteur. Le peptide nommé Spadin est en fait un peptide plus petit dérivant du propeptide de 44 acides aminés, qui a la même affinité que celui-ci pour le récepteur NTR3 et dont la structure est conservée.

Spadin est capable d'inhiber les courants générés par les canaux TREK1 dans différents types cellulaires, y compris dans les neurones d'hippocampe enregistrés à partir de tranches de cerveaux de souris. L'application de spadin sur ces tranches inhibe fortement les courants activés par l'acide arachidonique. Cet effet n'existe pas lorsque des neurones provenant de tranches de cerveaux de souris TREK1<sup>-/-</sup> sont enregistrés dans ces conditions. Spadin interagit donc de façon spécifique avec le canal TREK1. C'est d'ailleurs le premier inhibiteur direct du canal connu à ce jour, qui sera certainement très utile pour comprendre l'implication de ceux-ci dans diverses pathologies. L'hypothèse qui a été faite par les auteurs de cette étude est qu'un composé capable d'inhiber le canal TREK1 devrait avoir des conséquences sur le comportement des animaux vis-à-vis de la dépression. En effet, comme nous l'avons vu dans la première partie, les souris TREK1<sup>-/-</sup> sont résistantes à la dépression. De plus, une étude chez l'homme a permis d'identifier une association entre certaines isoformes du gène TREK1 et une résistance aux traitements classiques contre la dépression (Perlis *et al.*, 2008).

L'effet antidépresseur de spadin a ainsi été démontré par de nombreuses expériences : des tests comportementaux révélateurs de l'état dépressif ou non des rongeurs dans un premier temps mais aussi en mesurant l'activation du facteur de transcription CREB (cAMP Response Element Binding) et la neurogenèse dans la zone subgranulaire du gyrus denté. Ces deux derniers effets sont caractéristiques de l'action des antidépresseurs classiques, tels que la fluoxétine.

L'effet de spadin sur le canal TREK1 est double puisqu'il diminue le courant généré par le canal TREK1, mais il favorise également l'internalisation du canal. Cela provoque alors la dépolarisation du neurone présynaptique, ce qui aurait pour conséquence de réduire l'effet auto-inhibiteur que la libération de sérotonine produit sur ce neurone, comme cela a été suggéré dans le cas des souris TREK1<sup>-/-</sup>. La conséquence est alors une transmission sérotoninergique améliorée au niveau du neurone post-synaptique, et un effet antidépresseur. La principale différence entre spadin et les antidépresseurs classiques est le temps nécessaire pour que le composé produise son effet. La fluoxétine, comme les autres antidépresseurs classiques, produit son effet après 15 jours de traitement chez les rongeurs et quatre à six semaines chez l'homme, alors que l'effet maximal de spadin est obtenu après





**Figure 66 : Représentation schématique de la régulation du canal TREK1 par le NTSR3 (Sortilin) et Spadin.**

A gauche, dans les conditions physiologiques, les concentrations de spadin sécrété ne sont pas suffisantes pour abolir complètement l'activité du canal *via* son internalisation et/ou par blocage direct.

A droite, dans les conditions d'un traitement avec spadin, la concentration de spadin est suffisante pour permettre l'internalisation de tous les canaux présents à la surface et d'abolir l'activité de celui-ci, comme cela est le cas pour les cellules des animaux *kcnk2<sup>-/-</sup>* (*TREK1<sup>-/-</sup>*) qui n'expriment pas le canal (modifiée d'après *Mazella et al.*, 2010).

seulement quatre jours de traitements chez les rongeurs. Cette longue latence est due à ce phénomène d'autoinhibition du neurone présynaptique par la sérotonine. Les antidépresseurs classiques inhibent la recapture de la sérotonine dans la fente synaptique, ce qui a deux effets, d'une part augmenter la transmission au niveau post-synaptique, mais l'élévation de la concentration de sérotonine stimule également les autorécepteurs inhibiteurs situés sur le neurone présynaptique. La latence observée est en fait le temps nécessaire pour que ces autorécepteurs soient désensibilisés et que seule la transmission post-synaptique soit améliorée. Cette latence n'existe pas pour le peptide spadin, ce qui renforce son potentiel thérapeutique. De plus, spadin est un peptide naturel, ce qui permettrait de réduire les effets secondaires régulièrement observés au cours de traitements par les antidépresseurs classiques.

Spadin fonctionne donc selon deux modes, l'un physiologique et l'autre que l'on observe dans un contexte thérapeutique, lorsque le peptide est présent en excès (*Figure 66*).

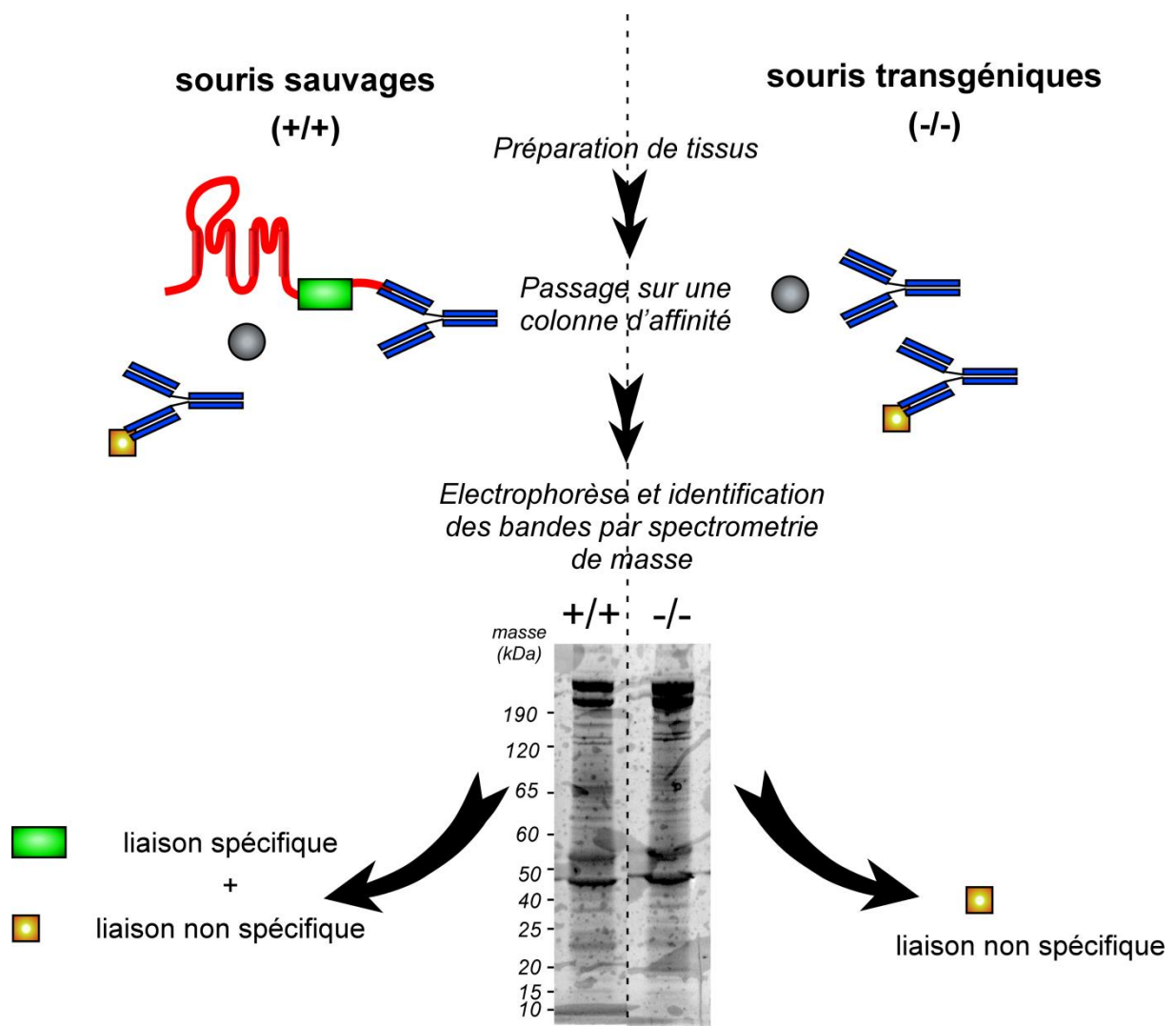
Dans les conditions physiologiques, TREK1 et le précurseur du récepteur NTSR3 s'associent dans les vésicules de transport entre le Golgi et la membrane plasmique. NTSR3 favorise ainsi l'adressage du canal à la surface. Dans ces vésicules, le peptide spadin va être produit par le clivage du précurseur de NTSR3 par la furine, qui va ainsi permettre la maturation du récepteur. Quand les vésicules fusionnent avec la membrane plasmique, spadin est excrété et peut alors se lier au récepteur NTSR3 et/ou au canal TREK1. Une telle liaison va conduire à l'inhibition des courants, l'internalisation de ce complexe dans les endosomes qui sera finalement dégradé. Lorsque le peptide spadin est présent en grande quantité, dans le cas d'un traitement par exemple, le rythme d'internalisation est augmenté, menant à une disparition complète des canaux TREK1 de la membrane plasmique. Cette perte conduit à une situation proche de celle observée chez les souris TREK1<sup>-/-</sup>, et donc à l'effet antidépresseur observé.

#### d. Interaction de TREK1 avec une sous-unité du complexe de transport vésiculaire

Récemment, une interaction entre l'extrémité N-terminale du canal TREK1 et la sous-unité du manteau protéique  $\beta$ COP a été montrée grâce à une expérience de double hybride chez la levure utilisant l'extrémité N-terminale de TREK1 comme appât (Kim *et al.*, 2010). Cette interaction a été vérifiée *in vitro* et *in vivo*, à partir de lignées cellulaires où les deux protéines co-immunoprécipitent et sont colocalisées. L'extrémité N-terminale a très peu été impliquée dans les différentes régulations du canal jusqu'à maintenant, c'est ici un des premiers exemples. Les conséquences de cette interaction sont également surprenantes, car  $\beta$ COP augmente la quantité de canaux TREK1 à la membrane plasmique. Les courants TREK1



enregistrés en présence de  $\beta$ COP sont doublés par rapport aux courants enregistrés dans les cellules qui n'expriment que TREK1. Cet effet de  $\beta$ COP est différent de celui que l'on a pu observer sur les canaux TASK, où  $\beta$ COP entraîne une rétention du canal dans le réticulum endoplasmique.  $\beta$ COP semble donc pouvoir jouer un rôle soit de signal antérograde, qui permet l'expression de protéines à la membrane plasmique, soit rétrograde, qui permet de retenir certaines protéines dans le réticulum endoplasmique. Le rôle exact de  $\beta$ COP n'est pas encore très bien compris et son effet semble dépendre de sa protéine partenaire. De plus, la délétion de l'extrémité N-terminale de TREK1 entraîne une rétention du canal dans un compartiment intracellulaire, démontrant ainsi l'importance de cette extrémité dans le trafic intracellulaire du canal. Cette interaction n'a toutefois pas été démontrée dans un système natif.



**Figure 67 : Identification de nouveaux partenaires des canaux K<sub>2P</sub>.**

Cette technique d'immunoprécipitation est réalisée en parallèle sur des tissus, cerveaux en l'occurrence, de souris sauvages et de souris transgéniques (TREK1<sup>-/-</sup> par exemple). Les tissus sont lysés dans des conditions non dénaturantes afin de préserver les interactions protéiques, et mis en présence d'un anticorps spécifique du canal étudié. Après passage sur une colonne d'affinité, les complexes protéiques sont élués et séparés sur un gel une dimension. Les protéines ainsi récupérées sont ensuite identifiées par spectrométrie de masse. L'utilisation de tissus issus de souris transgéniques permet d'éliminer les protéines qui se fixent de façon non-spécifique sur l'anticorps ou la colonne d'affinité.

### III RESULTATS

#### III.1 LA PROTEINE Mtap2 EST IMPLIQUEE DANS LE TRAFIC ET L'EXPRESSION DU CANAL TREK1 (*ARTICLE 1*)

Avant mon arrivée au laboratoire, une étude a débuté dont le but était de rechercher d'éventuelles protéines partenaires du canal TREK1 par une approche protéomique (*Figure 67*). Le Dr Guillaume Sandoz a réalisé une expérience qui consistait à immunoprécipiter les complexes canaux natifs à partir de cerveaux de souris, dans des conditions non dénaturantes pour préserver les interactions protéine-protéine. Cette expérience a été réalisée avec un anticorps qui reconnaît spécifiquement le canal TREK1, à partir de cerveaux de souris sauvages et de cerveaux de souris qui n'expriment pas le canal TREK1. Les complexes protéiques obtenus à partir de chacune des conditions ont été séparés sur un gel une dimension, qui a été par la suite analysé par spectrométrie de masse afin d'identifier les protéines précipitées. De très nombreuses protéines ont ainsi été précipitées dans les deux conditions mais seulement quatre étaient différentes entre les deux conditions. Toutes les autres se sont révélées être des interactions non spécifiques avec l'anticorps ou le système de précipitation. L'utilisation des souris TREK1<sup>-/-</sup> a donc permis d'identifier des interactions à priori spécifiques. La première protéine de cette liste à avoir été étudiée est l'AKAP-150. Son interaction avec le canal TREK1 s'est révélée exacte et a des conséquences fonctionnelles importantes. Elle modifie profondément l'activité et le comportement des canaux TREK (*Figure 64*) (Sandoz *et al.*, 2006).

A mon arrivée dans le laboratoire, nous avons débuté l'étude d'une seconde protéine, Mtap2 (Microtubule Associated Protein 2) identifiée grâce à la même technique. Mtap2 est une protéine neuronale et cytosolique, principalement exprimée dans le compartiment somatodendritique. Elle interagit avec les microtubules et participe à la stabilisation du réseau de microtubules (Goldstein and Yang, 2000) (Kashina *et al.*, 2004). Il existe quatre isoformes de Mtap2 chez les mammifères, toutes sont issues d'un même gène épissé de diverses façons. Toutes possèdent néanmoins des sites d'interaction avec les microtubules, et avec la PKA, permettant de lier la PKA aux microtubules dans diverses structures cérébrales (Obar *et al.*, 1989). La localisation de Mtap2 dans le cerveau est assez proche de celle de la sous-unité TREK1. Dans certaines structures, notamment le bulbe olfactif, le striatum, l'hippocampe et le cervelet, les deux protéines sont présentes en grande quantité. La sous-unité TREK2, très proche de TREK1 est également présente dans le cerveau



et dans certaines zones, TREK2 et Mtap2 sont toutes deux exprimées, comme le bulbe olfactif, l'hippocampe et le cervelet. De plus, les canaux TREK1 sont connus pour interagir avec le cytosquelette et pour être régulés par la PKA. Tous ces éléments nous ont indiqué qu'une interaction entre ces deux protéines était possible. Nous avons décidé d'étudier plus précisément l'éventuelle interaction entre les canaux TREK et la protéine Mtap2.

J'ai débuté cette étude lors de mon stage de Master pendant lequel j'ai été encadré par le Dr Guillaume Sandoz. Nous l'avons poursuivie et terminée lors de la première année de ma thèse. Nous avons donc réalisé ensemble une partie des expériences de biologie moléculaire (clonage) et de biochimie (co-immunoprécipitation). J'ai par ailleurs effectué les expériences d'immunofluorescence sur les cellules en culture et sur les neurones primaires en culture, ainsi que toutes les mesures d'électrophysiologie sur cellules de mammifères, alors que Guillaume Sandoz a accompli les expériences de quantification de surface et l'électrophysiologie sur les ovocytes de xénope.

Nous avons choisi d'utiliser l'isoforme c de la protéine Mtap2. Ce variant d'épissage est une forme courte, plus facile à manipuler mais dont la séquence est néanmoins retrouvée dans toutes les autres isoformes. Mtap2c contient également, comme tous les autres variants les sites d'interaction pour la PKA et pour les microtubules. Nous avons dans un premier temps réalisé des expériences d'immunocytochimie et de co-immunoprécipitation.

La co-transfection de Mtap2c avec TREK1 dans des cellules COS-7 ou MDCK a révélé une colocalisation des deux protéines. De façon surprenante, lorsque Mtap2 est exprimée seule, sa localisation est diffuse dans le cytoplasme. En revanche, si TREK1 est également présent dans ces cellules, Mtap2 est relocalisée au niveau de replis dans la membrane plasmique et de régions riches en actine dans lesquelles TREK1 est abondant. Cette interaction a par la suite été confirmée par co-immunoprécipitation à partir de lysats de cellules COS transfectées avec l'une ou l'autre, ou bien les deux protéines. En absence de TREK1, la protéine Mtap2c ne peut pas être précipitée avec l'anticorps anti-TREK1. L'interaction physique entre les deux protéines était ainsi démontrée.

Nous avons ensuite cherché à savoir quels étaient les effets de cette interaction. Pour cela, j'ai réalisé des expériences de patch clamp sur des cellules COS-7 exprimant TREK1 seul ou bien TREK1 et Mtap2c. J'ai alors observé une augmentation des courants TREK1 lorsque Mtap2c est également présente dans les cellules, sans modification des propriétés biophysiques des courants TREK1. Les courbes courant/potentiel de TREK1 en présence de Mtap2c, aussi bien en conditions physiologiques qu'en condition de potassium symétrique se sont révélées identiques à celles enregistrées en absence de Mtap2c, hormis évidemment





la taille de ces courants. De plus, le canal TREK1 reste sensible à l'acide arachidonique malgré la présence de Mtap2c.

Pour confirmer l'interaction directe de la sous-unité TREK1 avec Mtap2 nous avons construit un mutant de Mtap2c incapable de lier les microtubules (Ozer and Halpain, 2000). En effet, l'interaction entre TREK1 et Mtap2c pouvait être relayée par les microtubules. Nous avons montré grâce à ce mutant que cela n'était pas le cas et que l'interaction entre les deux protéines était très probablement directe. Le mutant Mtap2c incapable de lier les microtubules est toujours capable de co-immunoprécipiter avec TREK1. De la même façon, les deux protéines colocalisent dans un système d'expression hétérologue. La seule différence entre Mtap2c et le mutant Mtap2c est sa capacité à augmenter les courants générés par TREK1. Lorsque Mtap2c n'est pas capable de lier les microtubules, elle interagit toujours avec TREK1 mais n'a plus aucun effet sur ses courants. Ces résultats nous ont alors permis de comprendre que l'augmentation des courants TREK1 repose sur les microtubules. Ceci a été confirmé par des expériences de quantification du canal TREK1 à la membrane plasmique. Cette augmentation est du même ordre de grandeur que celle enregistrée en patch clamp dans les cellules exprimant TREK1 et Mtap2c. Le mutant Mtap2c incapable de lier les microtubules ne modifie pas la quantité de canaux TREK1 à la membrane plasmique, comme attendu compte tenu des résultats obtenus en patch clamp. Ainsi nous avons montré que Mtap2 interagit directement avec la sous-unité TREK1. La capacité de Mtap2 de s'associer aux microtubules permet de modifier le trafic intracellulaire, des vésicules de transport notamment et l'adressage du canal au niveau de la membrane plasmique.

L'étape suivante a été de localiser le site d'interaction de Mtap2c sur la sous-unité TREK1. La délétion de l'extrémité C-terminale de TREK1 abolit complètement l'interaction avec Mtap2c. Nous avons procédé à une restitution progressive de l'extrémité C-terminale du canal et nous avons identifié une séquence de 25 acides aminés, située entre les positions 335 et 360 du canal. Cette séquence comprend un segment de huit acides aminés qui contient quatre résidus lysine chargés positivement. Ce domaine est également présent dans la sous-unité TREK2 mais pas TRAAK. La mutation de ces quatre lysines empêche l'interaction de Mtap2 avec le canal.

Puis, nous avons cherché à déterminer la spécificité de cette interaction. Comme cela avait été prédit par la présence des quatre lysines sur la sous-unité TREK2, Mtap2c interagit avec la sous-unité TREK2 et produit les mêmes effets que sur TREK1. Une telle interaction n'a été retrouvée pour aucune autre sous-unité de la famille des  $K_{2P}$ .

Enfin, nous avons cherché à savoir si Mtap2 et AKAP-150, toutes deux partenaires du canal TREK1 pouvaient interagir en même temps avec la sous-unité canal, et si leurs effets pouvaient être additionnels. Les sites d'interaction de ces deux protéines sur l'extrémité C-



terminale du canal sont assez restreints et plutôt éloignés, suggérant qu'elles peuvent être liées au canal en même temps. Des expériences ont été réalisées dans des ovocytes de xénope. Elles ont montré que les courants TREK1 sont significativement plus grands lorsque le canal est exprimé avec ses deux protéines partenaires que lorsque l'une des deux protéines seulement est présente avec le canal.

Ce résultat suggère donc que Mtap2 et AKAP-150 ont des effets indépendants et additifs, Mtap2 augmentant le nombre de canaux à la membrane plasmique, et AKAP-150 stimulant l'activité de ces canaux. Nous avons également démontré que les trois protéines sont présentes ensemble dans les mêmes densités post-synaptiques de neurones d'hippocampe en culture.



## Article 1

### **Mtap2 is a constituent of the protein network that regulates Twik-Related K<sup>+</sup> channel expression and trafficking**

Sandoz G., **Tardy M.**, Thümler S., Feliciangeli S., Lazdunski M. and Lesage F.

**The Journal of Neuroscience**, August 20, 2008, 28(34):8545-52.



# Mtap2 Is a Constituent of the Protein Network That Regulates Twik-Related $K^+$ Channel Expression and Trafficking

Guillaume Sandoz, Magalie P. Tardy, Susanne Thümmel, Sylvain Feliciangeli, Michel Lazdunski, and Florian Lesage

Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 6097, Institut Paul Hamel, 06560 Valbonne Sophia-Antipolis, France, and Université de Nice Sophia-Antipolis, Faculté des Sciences, 06000 Nice, France

Twik-related  $K^+$  (TREK) channels produce background currents that regulate cell excitability. *In vivo*, TREK-1 is involved in neuronal processes including neuroprotection against ischemia, general anesthesia, pain perception, and mood. Recently, we demonstrated that A-kinase anchoring protein AKAP150 binds to a major regulatory domain of TREK-1, promoting drastic changes in channel regulation by polyunsaturated fatty acids, pH, and stretch, and by G-protein-coupled receptors to neurotransmitters and hormones. Here, we show that the microtubule-associated protein Mtap2 is another constituent of native TREK channels in the brain. Mtap2 binding to TREK-1 and TREK-2 does not affect directly channel properties but enhances channel surface expression and current density. This effect relies on Mtap2 binding to microtubules. Mtap2 and AKAP150 interacting sites in TREK-1 are distinct and both proteins can dock simultaneously. Their effects on TREK-1 surface expression and activation are cumulative. In neurons, the three proteins are simultaneously detected in postsynaptic dense bodies. AKAP150 and Mtap2 put TREK channels at the center of a complex protein network that finely tunes channel trafficking, addressing, and regulation.

**Key words:** potassium channels; proteomics; microtubules; trafficking; postsynaptic dense bodies; scaffolding

## Introduction

$K^+$  channels allow the passive and selective transport of  $K^+$  through the cell membrane. They control  $K^+$  homeostasis, cell volume, and excitability. With 77 genes encoding pore-forming subunits,  $K^+$  channels form the largest family of ion channels. Among them, 15 are structurally related and form a subfamily of subunits with four membrane-spanning segments (M1 to M4) and two pore (P1 and P2) domains. These  $K_{2p}$  channels are active as dimers and produce almost time- and voltage-independent background currents (Lesage and Lazdunski, 2000; Lesage, 2003). These currents drive the membrane potential toward the  $K^+$  equilibrium potential and affect input resistance. A subclass of  $K_{2p}$  channels including TREK-1, TREK-2, and the more distant Twik-related arachidonic acid-stimulated  $K^+$  channel (TRAAK) have unique properties. They display low basal activity when expressed alone (Fink et al., 1996, 1998; Bang et al., 2000; Lesage et al., 2000). They can be strongly stimulated by temperature (Maingret et al., 2000b), mechanical stretch, and cell swelling

(Patel et al., 1998), intracellular acidification (Maingret et al., 1999), arachidonic acid, and other polyunsaturated fatty acids (PUFAs) (Fink et al., 1998), lysophospholipids (Maingret et al., 2000a), and PIP2 (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate) (Chemin et al., 2005; Lopes et al., 2005), or by pharmacological agents such as volatile anesthetics (Patel et al., 1999) and riluzole (Duprat et al., 2000). TREK-1 gene inactivation produces mice less sensitive to volatile anesthetics (Heurteaux et al., 2004). These mice have also impaired neuroprotection afforded by PUFAs (Heurteaux et al., 2004) and altered perception of pain (Al-loui et al., 2006). They display a depression-resistant phenotype (Heurteaux et al., 2006).

A-kinase anchoring protein 150 (AKAP150) is a constituent of native TREK-1 channels in the brain (Sandoz et al., 2006). AKAP150 interacts with the post-M4 region of TREK-1 that is necessary for activation by PUFAs, phospholipids, stretch and intracellular acidification, and for regulation by neurotransmitters and hormones. Binding of AKAP150 to this regulatory domain switches the low activity outwardly rectifying TREK-1 current into a robust leak conductance. Inhibition of the TREK-1/AKAP150 complex by Gs-coupled receptors is as extensive as for TREK-1 alone, but is faster. Inhibitions of TREK-1/AKAP150 by a PKC activator such as PMA and by Gq-coupled receptors are much reduced compared with TREK-1 alone.

Here, we characterized the interaction of TREK-1 with another of its partners: the microtubule-associated protein Mtap2. Mtap2 promotes an increase of the TREK-1 current without affecting its properties. This current enhancement is attributable to

Received Feb. 7, 2008; revised July 10, 2008; accepted July 12, 2008.

This work was supported by the Ligue Nationale Contre le Cancer, Fondation pour la Recherche Médicale, and Japan–France Integrated Action Program SAKURA (06980UF). We thank Martine Jodar for excellent technical assistance. S.T. received a postdoctoral fellowship from Fondation pour la Recherche Médicale. F.L. is the recipient of a “contrat d’interface” from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale/Centre Hospitalier Universitaire, Unité de Neurologie, Hôpital Pasteur (Nice, France).

Correspondence should be addressed to Florian Lesage, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Centre National de la Recherche Scientifique, 660 route des Lucioles, 06560 Valbonne Sophia-Antipolis, France. E-mail: lesage@ipmc.cnrs.fr.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.1962-08.2008

Copyright © 2008 Society for Neuroscience 0270-6474/08/288545-08\$15.00/0





a channel density increase at the plasma membrane and relies on binding of Mtap2 to microtubules. This effect is specific to TREK-1 and TREK-2 and was not observed for other less closely related  $K_{2P}$  channels. Mtap2 binds to a site distinct from the AKAP150 interacting site. The three proteins TREK-1, Mtap2, and AKAP150 can interact simultaneously and were codetected in postsynaptic dense bodies of hippocampal neurons.

## Materials and Methods

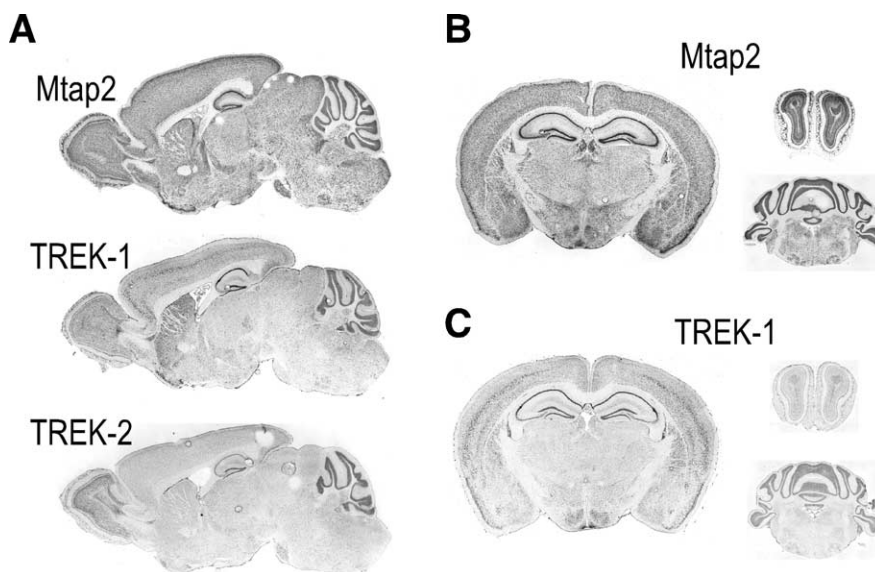
**Molecular biology.** Mtap2c was cloned from a mouse brain cDNA library and inserted into pCMV-Myc (Clontech) and pIRES2 HcRed. This vector was derived from pIRES2 enhanced green fluorescent protein (EGFP) (Clontech) by substituting HcRed coding sequence to EGFP. Mtap2c-mut was produced by PCR. Plasmids for expression of AKAP150, TREK-1, and the truncated mutants of TREK-1 have been described previously (Patel et al., 1998; Sandoz et al., 2006).

**Cell culture and electrophysiology.** Hippocampal neurons from neonate mice were isolated and transfected as previously described (Sandoz et al., 2006). Mabin–Darby canine kidney (MDCK) cells were grown in Minimal Essential Medium (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin in a humidified incubator with 5%  $CO_2$  at 37°C. MDCK cells were transfected with Lipofectamine 2000 (Invitrogen). COS-7 cells were cultured and transfected using DEAE-dextran as previously described (Patel et al., 1998). After transfection, 25 mM KCl was added to the culture medium. For electrophysiological recordings, the internal solution contained 150 mM KCl, 3 mM  $MgCl_2$ , 5 mM EGTA, and 10 mM HEPES at pH 7.2 with KOH, and the external solution contained 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 3 mM  $MgCl_2$ , 10 mM HEPES at pH 7.4 with NaOH.

Defolliculated *Xenopus* oocytes were injected with cRNA encoding TREK-1 (0.3 ng), AKAP150 (0.3 ng), and Mtap2c (0.3 ng). They were used for electrophysiological studies 2–4 d after injection. In a 0.3 ml perfusion chamber, a single oocyte was impaled with two standard microelectrodes (1–2.5 M $\Omega$  resistance) filled with 3 M KCl and maintained under voltage clamp by using a Dagan TEV 200 amplifier, in standard ND96 solution (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM  $CaCl_2$ , 2 mM  $MgCl_2$ , 5 mM HEPES, pH 7.4 with NaOH). Stimulation of the preparation, data acquisition, and analysis were performed using pClamp software (Molecular Devices).

**Cell surface quantification.** To quantify TREK-1 at the cell surface, a hemagglutinin (HA)-tag was introduced in the P2–M4 extracellular loop to generate TREK1-HA. This modification did not affect the functional expression of TREK-1 (data not shown). COS cells were transfected by TREK1-HA in the presence or in the absence of Mtap2c. Twenty-four hours after transfection, cells were incubated at 4°C in the presence of anti-HA antibodies ( $\alpha$ HA-ab), (mouse monoclonal antibody HA-7; Sigma-Aldrich). TREK1-HA/ $\alpha$ HA-ab complexes were detected with peroxidase-coupled secondary antibodies (sheep polyclonal anti-mouse antibodies; GE Healthcare) and quantified by using a colorimetric assay (Cornet et al., 2002).

**Immunocytochemistry.** Transfected cells on coverslips were fixed with 0.1 M phosphate buffer containing 4% paraformaldehyde (15 min at 21–22°C), and then permeabilized with PBS/0.1% Triton X-100 (PBST) and blocked 1 h with 5% horse serum (HS) in PBST. Primary and secondary antibodies were diluted in PBST/5% HS PBST and incubated 1 h at 21–22°C. Three 5 min washes with PBST were performed between each incubation step and at the end of the procedure. Coverslips were mounted in Dako Fluorescent Mounting medium (Dako). The following antibodies were used: rabbit polyclonal TREK-1 antibodies (Fink et al.,



**Figure 1.** Localization of TREK-1, TREK-2, and Mtap2 mRNA by *in situ* hybridization in adult mouse sagittal (**A**) and coronal sections of brain, olfactory bulb, and cerebellum (**B**, **C**). Data were retrieved from the Allen brain database ([www.brain-map.org](http://www.brain-map.org)).

1996), mouse monoclonal antibody against Myc epitope (clone 9E10; Roche Diagnostics), mouse monoclonal antibodies against Mtap2 (HM-2; Sigma-Aldrich), rat monoclonal antibody against HA epitope (clone 3F10; Roche Diagnostics), goat polyclonal antibodies against AKAP150 (C-20; Santa Cruz Biotechnology; sc-6445), goat anti-rabbit conjugated to Alexa Fluor 488 (Invitrogen), donkey anti-mouse conjugated to Alexa Fluor 594 (Invitrogen), and donkey anti-rat conjugated to Texas Red (Jackson ImmunoResearch). Microscopic analysis was performed with Axioplan 2 Imaging microscope (Carl Zeiss). The Pearson's correlation was calculated with ImageJ.

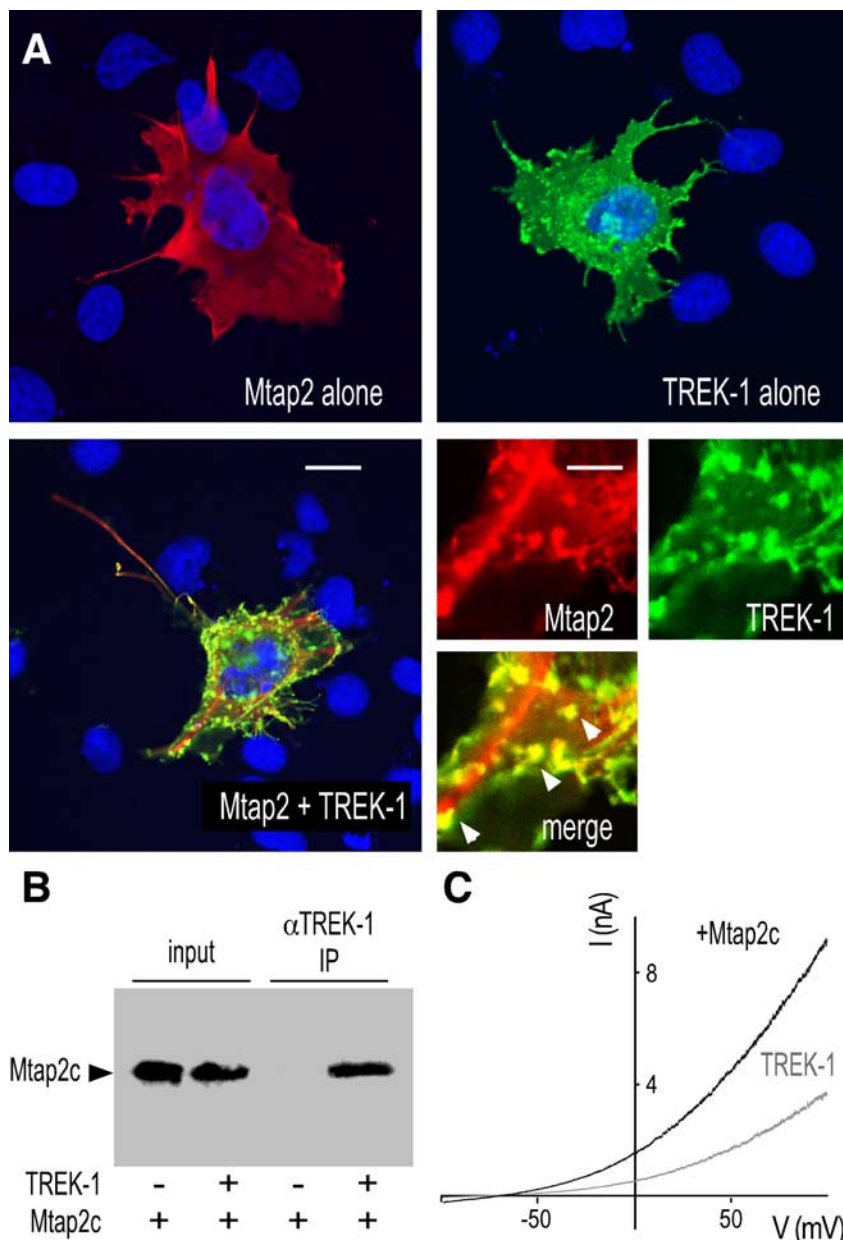
**Immunoprecipitation and Western blot analysis.** COS-7 cells were homogenized in PBS containing saponin (0.5% w/v), Triton X-100 (0.5% w/v), and protease inhibitors (Roche Diagnostics). Lysate were clarified by centrifugation at 20,000  $\times$  g for 30 min. Anti-TREK-1 antibodies were immobilized on protein A-Sepharose 4B Fast Flow (Sigma-Aldrich). The immunoprecipitated proteins were separated on 10% SDS polyacrylamide gel and blotted onto nitrocellulose membrane (Hybond-C Extra; GE Healthcare). Western blots were performed using a mouse monoclonal antibody against Myc epitope for Myc-tagged Mtap2c.

## Results

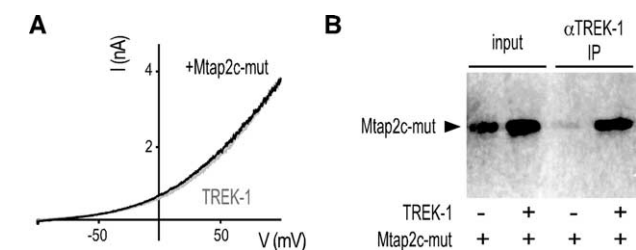
### Coprecipitation and colocalization of Mtap2 and TREK channels in the brain

Among the proteins coprecipitated by anti-TREK-1 antibodies from wild-type mice and absent from TREK-1<sup>−/−</sup> mice (Sandoz et al., 2006) was the microtubule-associated protein Mtap2 (also termed MAP2). Mtap2 binds to microtubules and stabilizes the microtubule network (Felgner et al., 1997). Mtap2 interacts also with protein kinase A (PKA) and links this kinase to microtubules in various brain regions (Harada et al., 2002). *In situ* hybridization showed that Mtap2 and TREK-1 distributions overlap in adult mouse brain (Lein et al., 2007). Mtap2 is expressed in many areas with the strongest signals found in olfactory bulb, striatum, cortex, hippocampus, and cerebellum (Fig. 1). In these locations, TREK1 is well expressed, particularly in cerebellar granule layer and hippocampus. In the cortex, Mtap2 and TREK-1 are not found in the same layers (Fig. 1A–C). TREK-2, a channel closely related to TREK-1, is not expressed in the striatum and only weakly in the cortex, as previously described in the rat brain (Talley et al., 2001). However, it was detected in olfactory bulb, hippocampus, and cerebellum together with TREK-1 and Mtap2





**Figure 2.** TREK-1/Mtap2 interaction in COS-7 cells. **A**, Immunodetection in permeabilized cells of myc-tagged Mtap2c (red labeling) and TREK-1 (green labeling) transfected alone (top panels) or together (bottom panels). The cell nuclei are in blue. The bottom left panel shows an entire cell. Scale bar, 15  $\mu$ m. The three other panels show an enlarged part of this cell. Scale bar, 5  $\mu$ m. In the merge panels, overlapping green and red labelings are in yellow. The arrowheads indicate actin-rich domains. **B**, Coprecipitation of myc-tagged Mtap2c by anti-TREK-1 antibodies. IP, Immunoprecipitation. **C**, Effects of Mtap2c expression on whole-cell currents. Currents were elicited by voltage ramps (from  $-100$  to  $+100$  mV, 1.5 s in duration) from cells expressing TREK-1 in the presence (black) or absence (gray) of Mtap2c.



**Figure 3.** A mutant of Mtap2c unable to bind to microtubules associates with TREK-1, but which does not promote a current increase. **A**, Effect of Mtap2c-mut expression on TREK-1 currents. Currents were elicited by voltage ramps (from  $-100$  to  $+100$  mV, 1.5 s in duration) from COS-7 cells expressing TREK-1 in the presence (black) or the absence (gray) of Mtap2c-mut. **B**, Coprecipitation of myc-tagged Mtap2c-mut by anti-TREK-1 antibodies from transfected COS-7 cells.

(Fig. 1A). Because of these overlaps and because TREK channels are known to be associated with the cytoskeleton and to be tightly regulated by PKA (Patel et al., 1998), we studied the functional consequences of the Mtap2/TREK interaction.

#### Mtap2/TREK-1 channel interaction in transfected cells

Several splice variants are produced from the gene encoding Mtap2 (Dehmelt and Halpain, 2005). Mtap2c is the shortest isoform. This splice variant shares the same sequence as the longer isoforms and keeps the ability to bind microtubules and PKA (Dehmelt and Halpain, 2005). We first tested the ability of Mtap2c to interact with TREK-1 in transiently transfected cells. Figure 2A shows a strong colabeling of TREK-1 and Mtap2c in transfected COS-7 cells. Expressed alone, Mtap2 has a diffuse cytoplasmic distribution. When expressed with TREK-1, it relocates to membrane ruffles and other actin-rich domains in which TREK-1 is mainly detected when expressed alone (Lauritzen et al., 2005). A similar TREK-1-dependent redistribution of Mtap2 was observed in transfected MDCK cells (see Fig. 4A). The physical interaction between the two proteins was next confirmed by coprecipitating Mtap2 with anti-TREK-1 antibodies from COS-7 lysates (Fig. 2B). In the absence of TREK-1 coexpression, Mtap2c was not precipitated. The functional impact of Mtap2 expression on TREK-1 was studied by whole-cell voltage clamp. As depicted in Figure 2C, Mtap2c expression promotes an increase of the basal TREK-1 current amplitude ( $2 \pm 0.3$ -fold at 50 mV;  $n = 19$ ;  $p < 0.05$ ). Unlike AKAP150, Mtap2c had no effect on the current–voltage ( $I$ – $V$ ) relationship in symmetrical  $K^+$  conditions (data not shown) (for the corresponding  $I$ – $V$  curves in *Xenopus* oocytes, see Fig. 6B) or on the stimulatory effect of arachidonic acid application (data not shown).

#### A Mtap2c mutant unable to bind to microtubules does not stimulate TREK-1

Mtap2 contains three repeated domains involved in the binding to microtubules (Lewis et al., 1988). Phosphorylation of two serine residues S350 and S382 located in these repeats prevents Mtap2c binding to polymerized tubulin. A mutant of Mtap2c in which both serines have been replaced by glutamate residues mimicking a phosphorylated state cannot bind microtubules (Ozer and Halpain, 2000). As shown in Figure 3A, coexpression of this Mtap2 mutant (termed here Mtap2c-mut) failed to significantly increase the TREK-1 current in COS-7 cells ( $51 \pm 9$  vs  $33 \pm 8$  nA/nF;  $n = 18$ ; not significantly different,  $p > 0.3$ ). However, this mutant coprecipitated (Fig. 3B) and colocalized (data not shown) with TREK-1. These results indicate that the associ-

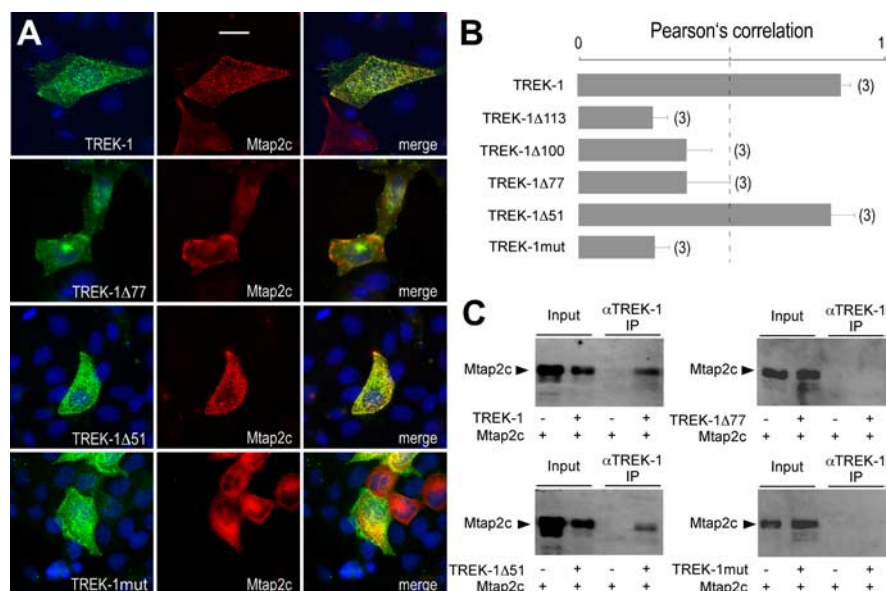




ation of Mtap2c with TREK-1 does not require the association of Mtap2 with microtubules, but that the functional effect on the current amplitude relies on this binding. To test the possibility that Mtap2 may affect the microtubule-based vesicular trafficking, and indirectly cell surface expression of TREK-1, we introduced a HA-tag in its P2–M4 extracellular loop to generate TREK1-HA. This modification did not affect the functional expression of TREK-1 and its regulation by Mtap2c (data not shown). TREK-1 channels at the cell surface were quantified by incubating nonpermeabilized cells with anti-HA antibodies, and then by detecting channel/antibody complexes using a peroxidase-coupled secondary antibody and a colorimetric assay. Mtap2c expression promoted an increase of the channel density at the surface. This increase ( $1.9 \pm 0.2$ -fold;  $n = 9$ ;  $p < 0.05$ ) fits quantitatively with the increase of recorded currents in the same expression conditions ( $2 \pm 0.3$ -fold at 50 mV;  $n = 18$ ;  $p < 0.05$ ). Furthermore, Mtap2c-mut did not significantly modify the amount of channels detected at the cell surface ( $1.1 \pm 0.1$ -fold;  $n = 9$ ), confirming that the binding of Mtap2c to microtubules is required to stimulate cell surface expression of TREK-1.

### Mapping of the Mtap2c binding site in TREK-1

In MDCK cells, TREK-1 and Mtap2c were colocalized (Fig. 4A). TREK-1 was detected in actin-rich membrane protrusions present at the cell periphery giving a punctuated labeling (Lauritzen et al., 2005). MDCK cells were chosen for K<sub>2P</sub> channel immunocytochemistry because they are better than COS-7 cells for this type of experiment (Decressac et al., 2004). The labeling overlap was quantified by calculating the Pearson's correlation coefficient (Pc). The closest to 1 this coefficient is, the strongest is the colocalization of the considered labeled proteins. Below 0.5, there is no significant codistribution. For TREK-1 and Mtap2c coexpression, Pc reached  $0.86 \pm 0.04$ . The deletion of the cytosolic C-ter domain of TREK-1 (TREK-1Δ113) resulted in a loss of colocalization ( $Pc = 0.20 \pm 0.07$ ), indicating that the Mtap2 binding site is present in this region. To map this site, we engineered a series of mutants in which the C-ter region of TREK-1 was progressively restored and tested the capacity of these mutants to colocalize with Mtap2c (Fig. 4B). No quantitative overlaps were observed with TREK-1Δ100 ( $Pc = 0.35 \pm 0.1$ ) and TREK-1Δ77 ( $Pc = 0.35 \pm 0.18$ ). A good colocalization was recovered for TREK-1Δ51 ( $Pc = 0.81 \pm 0.1$ ) (Fig. 4A). The Pearson's correlation coefficient was not significantly different from the coefficient calculated for the complete channel. As expected, Mtap2 was coprecipitated by anti-TREK-1 antibodies when coexpressed with TREK-1 and TREK-1Δ51 but not when coexpressed with TREK-1Δ77 (Fig. 4C). These results indicate the Mtap2c binding site is situated between residues 335 and 360 in TREK-1. This region includes an 8 aa segment (residues 342–349) containing four positively charged residues conserved in TREK-1 and TREK-2 (K342, K347, R348, K349). The equivalent segment in TRAAK has no charges but contains several proline residues (see supplemental Fig. 1, available at [www.jneurosci.org](http://www.jneurosci.org) as supplemental



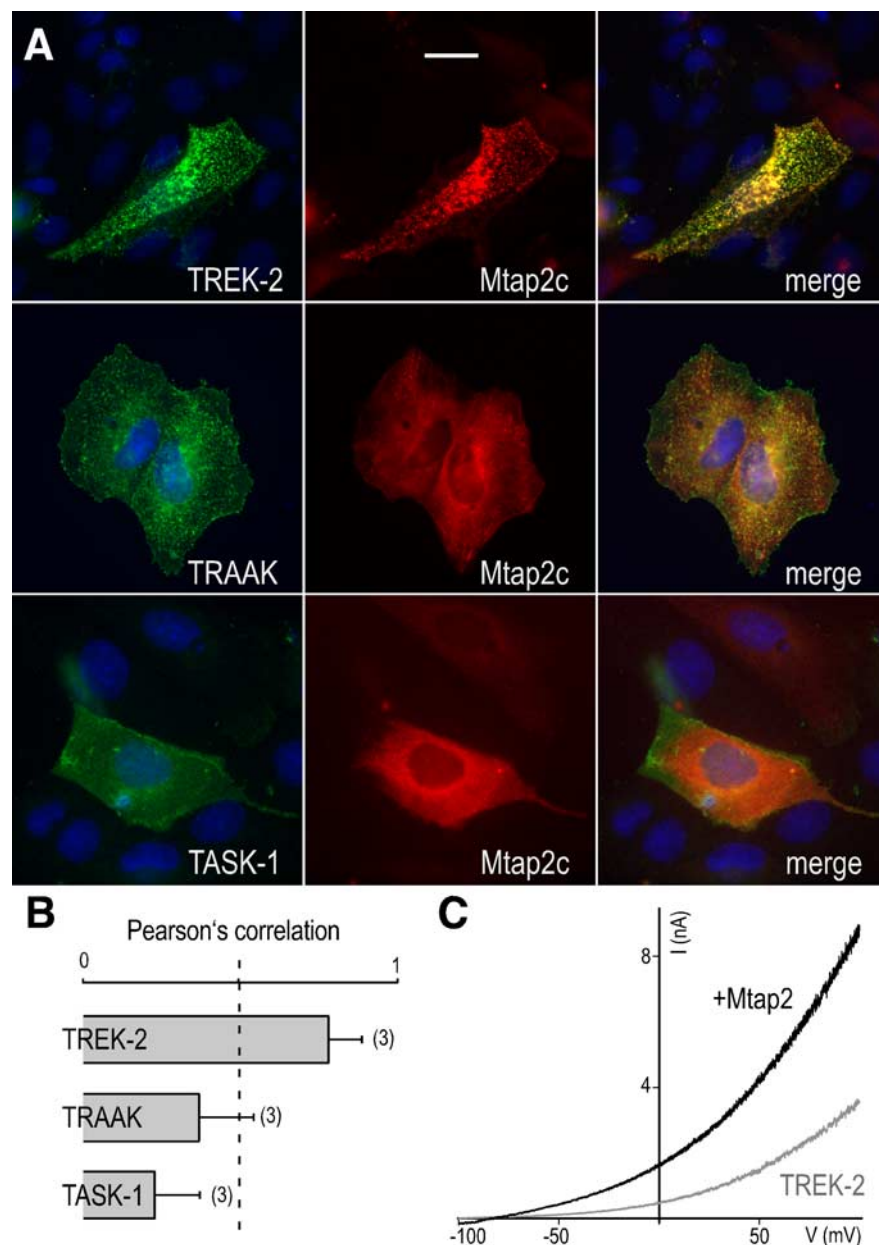
**Figure 4.** Mapping of the Mtap2 binding site in TREK-1. **A**, Immunolocalization of TREK-1, TREK-1Δ mutants of TREK-1 deleted in its cytoplasmic C-terminal part, or a TREK-1 mutant (TREK-1mut) containing K232P, K347P, R348P, and K349P substitutions (green labelings) and myc-tagged Mtap2c (red labeling) in transfected MDCK cells. Overlapping green and red labelings are in yellow. The cell nuclei are in blue. Scale bar, 10  $\mu$ m. **B**, The histograms represent the ratio of the mean Pearson's correlation that is calculated from the colabelings and that is proportional to the extent of colocalization. Error bars indicate SEM. The number of cells tested is shown in parentheses. **C**, Coprecipitation of myc-tagged Mtap2c by anti-TREK-1 antibodies from transfected cells.

material). In TREK-1, we substituted these basic residues by prolines to get TREK-1mut. TREK-1mut (K342P/K347P/R348P/K349P) was neither able to colocalize with Mtap2 (Fig. 4A,B) nor to coprecipitate Mtap2 (Fig. 4C). Its coexpression with Mtap2 in *Xenopus* oocytes did not provoke a statistically significant current increase ( $0.4 \pm 0.04$   $\mu$ A,  $n = 24$ , vs  $0.32 \pm 0.03$   $\mu$ A,  $n = 24$  at 0 mV;  $p > 0.16$ ). These results confirm the role of this region for Mtap2 binding to TREK-1. They also demonstrate that, in the absence of physical interaction with the channel, Mtap2 has no effect on the current levels.

### Mtap2 interaction and its functional effect is restricted to TREK-1 and TREK-2

TREK-2, TRAAK, and TASK-1 (TWIK-related acid-sensitive K<sup>+</sup> channel) channels were expressed with Mtap2c in MDCK cells for immunocytochemistry and in COS-7 cells for electrophysiology. A strong colocalization of Mtap2c and TREK-2 was observed (Fig. 5A), which is characterized by a Pearson's correlation coefficient of  $0.84 \pm 0.11$  (Fig. 5B), a value close to Pc calculated for TREK-1. The Mtap2 binding sites of TREK-1 and TREK-2 share 72% of sequence homology (supplemental Fig. 1, available at [www.jneurosci.org](http://www.jneurosci.org) as supplemental material). In contrast, there is no significant conservation of this sequence in TRAAK and TASK1 subunits. This sequence divergence was correlated with an absence of quantitative colocalization ( $Pc = 0.36 \pm 0.27$  for TRAAK and  $0.2 \pm 0.18$  for TASK-1) (Fig. 5A,B). Furthermore, Mtap2c was not coprecipitated with TRAAK or TASK-1 from transfected cells (data not shown). In terms of functional effects, Mtap2c induced a twofold increase of the TREK-2 current ( $84 \pm 15$  vs  $43 \pm 6$  nA/nF at 50 mV;  $n = 21$ ;  $p < 0.05$ ) (Fig. 5C), whereas Mtap2c was unable to modify TRAAK and TASK-1 currents (data not shown). Together, these results demonstrate that Mtap2 interacts physically and functionally with the closely related channels TREK-1 and TREK-2 but not with the more distant K<sub>2P</sub> channels TRAAK and TASK-1. They also show that the





**Figure 5.** Mtap2c interacts with TREK-1 and TREK-2, but not with the distantly related  $K_p$  channels TRAAK and TASK-1. **A**, Immunolocalization of myc-tagged Mtap2c and TREK-2, TRAAK, and TASK-1 in permeabilized MDCK cells. Channel subunits are in green and Mtap2c in red. Overlapping green and red labelings are in yellow. The cell nuclei are in blue. Scale bar, 5  $\mu$ m. **B**, The histograms represent the ratio of the mean Pearson's correlation calculated from the colabelings. Error bars indicate SEM. The number of cells tested is shown in parenthesis. **C**, Effect of Mtap2c expression on TREK-1 currents. Currents were elicited by voltage ramps (from  $-100$  to  $+100$  mV, 1.5 s in duration) from COS-7 cells expressing TREK-1 in the presence (black) or the absence (gray) of Mtap2c, as displayed.

Mtap2 effect is specific and does not affect the vesicular trafficking of TRAAK and TASK-1 channels at the cell surface.

#### Mtap2c and AKAP150 simultaneously interact with TREK-1

We previously showed that AKAP150 interacts with TREK-1 and converts it into an open leak channel. Binding occurs in a short domain located between residues 298 and 311. Mtap2c acts on channel density at the cell surface by interacting between residues 335 and 360. The distinct locations of the two binding sites suggested that the two associated proteins could be able to display simultaneously effects on TREK-1 activity. This hypothesis was tested in *Xenopus* oocyte in which heterologous coexpression of

more than two proteins can be easily obtained. First, we confirmed the effects observed in COS-7 cell. Mtap2c induced a similar twofold increase of TREK-1 ( $3 \pm 0.2$  vs  $1.5 \pm 0.2$   $\mu$ A;  $n = 48$ ) (Fig. 6A,E). Unlike AKAP150, Mtap2c did not modify the  $I$ - $V$  relationship in symmetrical  $K^+$  conditions ( $I_{-80 \text{ mV}}/I_{+80 \text{ mV}} = 0.61 \pm 0.1$  vs  $0.69 \pm 0.1$  for TREK-1 alone;  $n = 25$ ) (Fig. 6B). As observed in COS-7 cells, the stimulatory effect of Mtap2c depends on its binding to microtubules because Mtap2c-mut was unable to modify TREK-1 current density ( $2.2 \pm 0.2$  vs  $1.7 \pm 0.2$   $\mu$ A at 0 mV;  $n = 28$ ; not significantly different) (Fig. 6C). In *Xenopus* oocytes, AKAP150 expression induced an increase of the TREK-1 current as previously reported ( $2.2 \pm 0.2$ -fold at 0 mV) (Fig. 6D,E). When TREK-1 was expressed with both AKAP150 and Mtap2, the current increase was significantly larger than that induced by only one of the partner proteins ( $2.93 \pm 0.31$ -fold) (Fig. 6D,E). This result suggests that Mtap2 and AKAP150 have independent and additive effects on TREK-1, Mtap2 promoting more channels at the cell surface and AKAP150 stimulating activity of these channels.

The next important question was to know whether complexes including TREK-1, AKAP150, and Mtap2 are also formed in neuronal cells. Previously, we showed that TREK-1 and AKAP150 are particularly present in postsynaptic dense bodies of hippocampal neurons (Sandoz et al., 2006). Figure 7 shows that endogenous Mtap2 can be detected together with TREK-1 and AKAP150 in the same postsynaptic dense bodies.

#### Discussion

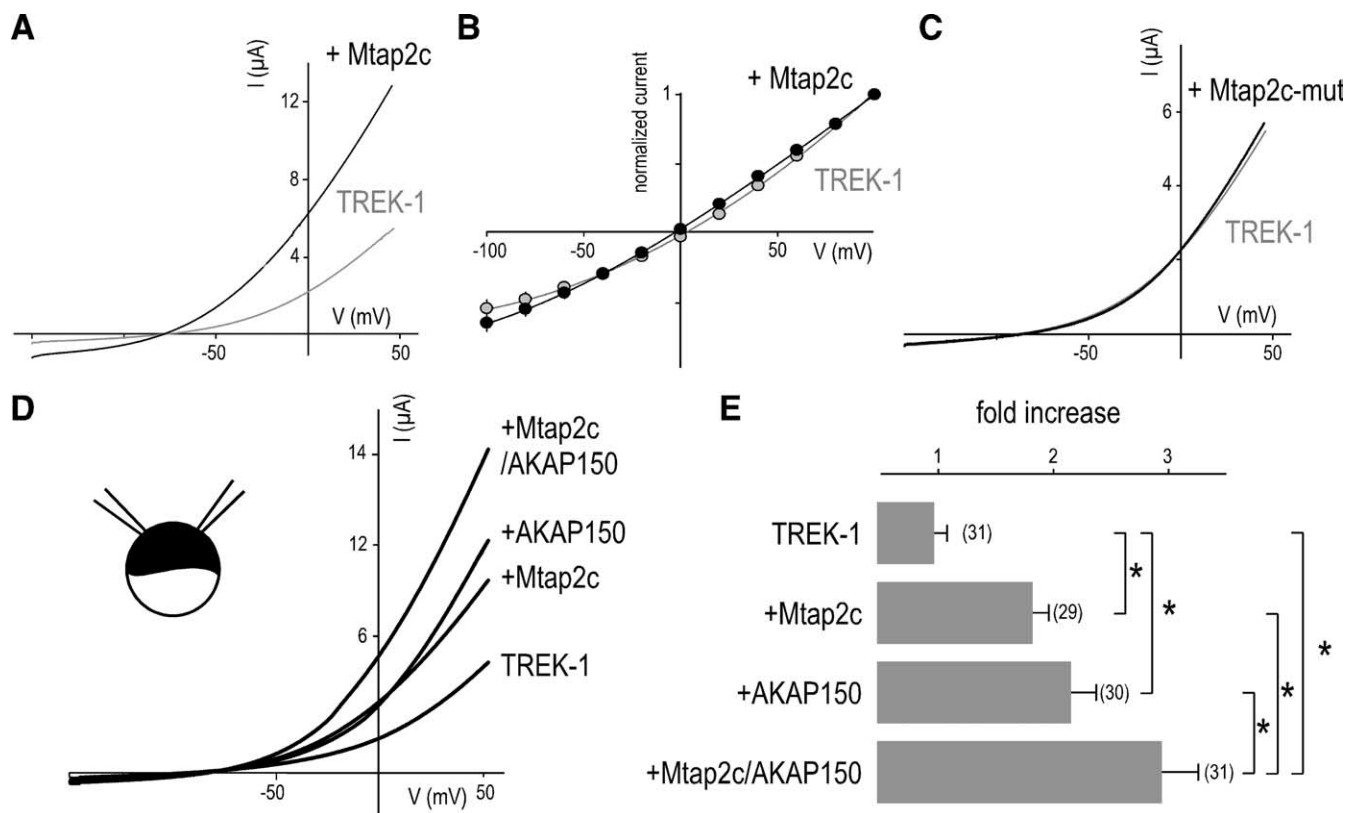
We previously showed that AKAP150 binds TREK-1, affecting its functional properties and its regulation by receptors to neurotransmitters and hormones (Sandoz et al., 2006). The present work demonstrates that Mtap2 is another protein that interacts physically and functionally with TREK-1. Like AKAP150, Mtap2 promotes an increase of the TREK-1 current amplitude (Fig. 2). However, unlike AKAP150,

Mtap2c does not directly stimulate channel activity but acts on its expression level at the cell membrane. This effect relies on the capacity of Mtap2 to bind to microtubules (Fig. 2). AKAP150 and Mtap2 associate with TREK-1 at distinct sites of its cytosolic C-ter. Their effects on TREK-1 surface addressing and channel activity are cumulative (Fig. 6).

How does Mtap2 affect TREK-1 density at the cell membrane of transfected cells? Microtubules, a polymer of  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulins, are dynamic structures of the cell cytoskeleton serving as rails along which cargoes can be transported. The microtubule-based transport of vesicles facilitates several mem-







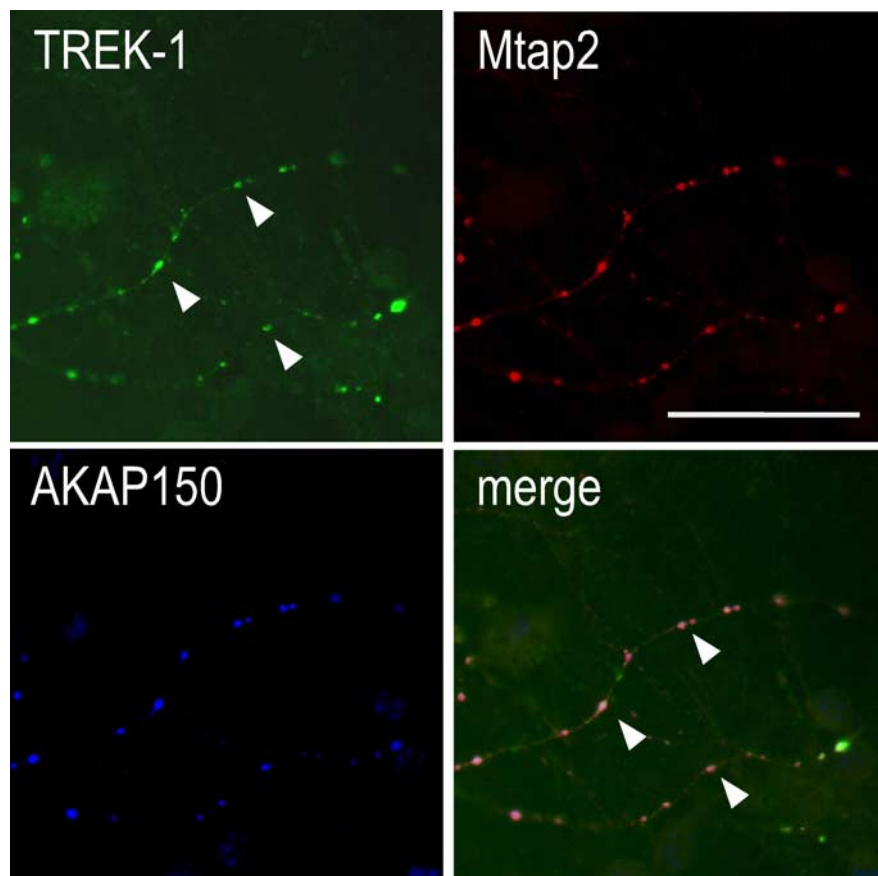
**Figure 6.** Mtap2c and AKAP150 act simultaneously on TREK-1. **A**, Effect of Mtap2c on TREK-1 in *Xenopus* oocyte. Currents were elicited by voltage ramps (from  $-150$  to  $+50$  mV, 1 s in duration). **B**, Current–voltage relationships in symmetrical  $K^+$  conditions. Steady-state currents were elicited by voltage pulses from a holding potential of 0 mV. **C**, As in **A** but for Mtap2c-mut coexpression. **D**, Effects of Mtap2c and AKAP150 alone or together on TREK-1. Currents were elicited by voltage ramps (from  $-150$  to  $+50$  mV, 1 s in duration). **E**, The histograms represent the ratio of the mean currents recorded at 0 mV in the four conditions. Error bars indicate SEM. Significant difference,  $^{**}p < 0.05$ . The number of cells tested is shown in parentheses.

brane trafficking steps including endocytosis and exocytosis, contributing to the maintenance of membrane proteins at the cell surface. One class of microtubule-binding proteins comprises motor protein kinesins and dyneins. These proteins mediate intracellular transport of membranous organelles, vesicles, and protein complexes along microtubules in many different cell types (for review, see Goldstein and Yang, 2000). A second class of microtubule-binding proteins is formed by the MAPs (microtubule-associated proteins), to which Mtap2 belongs. These proteins are not directly necessary for microtubule assembly and microtubule-based transport but modulate the dynamic assembly of microtubules (Gambelin et al., 1996; Al-Bassam et al., 2002). By acting on microtubule stability, Mtap2 may indirectly affect the trafficking of TREK-1 in COS-7 cells and *Xenopus* oocytes. However, this effect is specific to TREK-1 and TREK-2, and was not seen with other  $K_{2P}$  channels that do not bind Mtap2 (Fig. 5). This demonstrates that a simultaneous docking of Mtap2 to microtubules and TREK-1 is crucial for controlling the microtubule-based transport of the latter. Mtap2 interacts with the kinase PKA (Obar et al., 1989), whose activity is known to control motor protein activity (Kashina et al., 2004). Recruitment of PKA by Mtap2 to close proximity of vesicles containing TREKs, and modulation of adjacent motor proteins by PKA, may provide a molecular basis for the observed effect on TREK trafficking. Whether this increase in surface expression is attributable to stimulation of the forward transport or to inhibition of endocytosis remains to be determined.

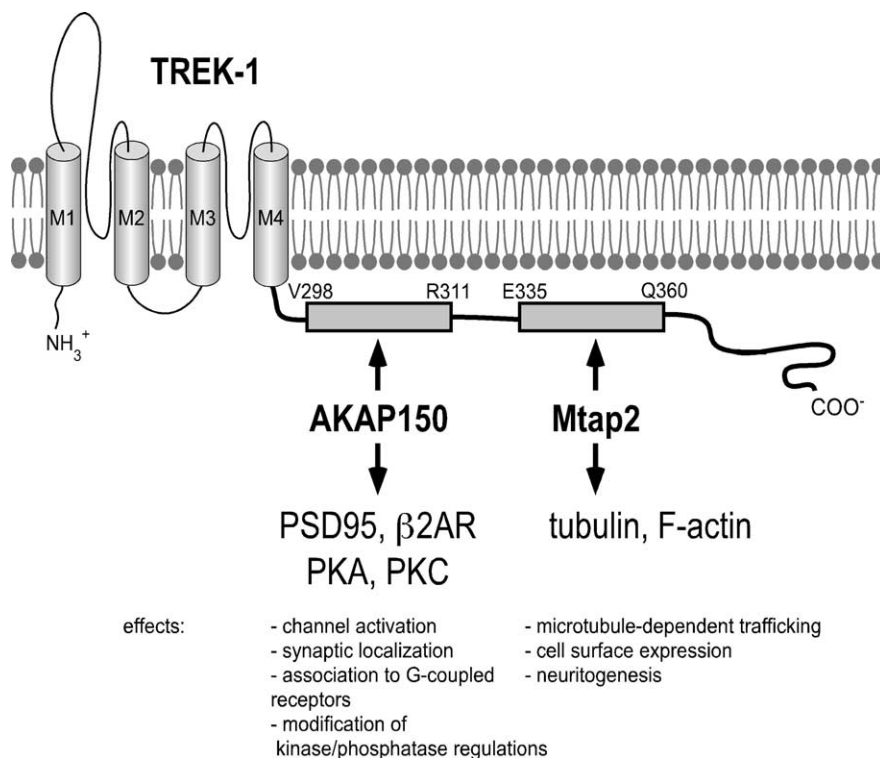
What is the role of the TREK-1/Mtap2 interaction in neurons? In neurons, kinesin and dynein motor proteins transport a wide variety of cargoes required at synapses, and in axons and dendrites them-

selves. Regionalization of microtubule-associated proteins is believed to contribute to selective transport and neuronal protein sorting (Burack et al., 2000). Mtap2 is mainly found in dendrites, dendritic spines, and postsynaptic densities (Cáceres et al., 1983; Langnaese et al., 1996). One of its functions may be to regulate microtubule-based transport and expression of TREK-1 in these postsynaptic locations. Mtap2 has a recognized role of scaffolding for the localization of signal transduction apparatus in dendrites, particularly near spines. It binds the actin skeleton and is found in close association with key dendritic proteins, including PKA, tyrosine kinases Src, Grb2, and Fyn (Dehmelt and Halpain, 2005), voltage-dependent calcium channel Cav1.2 (Davare et al., 1999), and NMDA receptors (Husi et al., 2000; Buddle et al., 2003). Mtap2 places TREK-1 at the center of dynamic postsynaptic protein complexes that comprises cytoskeleton elements, ion channels, neurotransmitters receptors, and regulatory proteins. In addition, a recent study has provided evidence for a presynaptic location and a presynaptic role of TREK-1. It has shown that gene inactivation of TREK-1 significantly reduces the potency of halothane to inhibit 4-aminopyridine-evoked releases of both glutamate and GABA from cerebocortical nerve terminals (Westphalen et al., 2007). It is also known that TREK-1 accumulates above and below a ligature in rat sciatic nerve (Bearzatto et al., 2000). The process is rapid and bidirectional, hence compatible with microtubule-based transport of channel-containing vesicles. At the early stage of neuronal development, Mtap2 is present in axon and in the axonal growth cone (Cáceres et al., 1986). In mature neurons, Mtap2 is mostly excluded from axons (Cáceres et al., 1986), but to our knowledge, its presence in the axon terminal has not been extensively studied. If present in nerve





**Figure 7.** Labeling of endogenous Mtap2 and AKAP150 and transfected TREK-1 in cultured hippocampal neurons. In the merge panel, the TREK-1 labeling is in green, Mtap2c in blue, and AKAP150 in red. The overlapping green, blue, and red labelings are in white. The arrowheads show postsynaptic dense bodies in which the three proteins can be detected. Scale bar, 20  $\mu$ m.



**Figure 8.** Mtap2 and AKAP150 place TREK-1 at the center of protein networks that regulate its trafficking to the cell surface, its addressing to postsynaptic dense bodies, and its channel activity.

terminals, Mtap2 may not only help to transport TREK-1 along axons but also to stabilize TREK-1 at the presynaptic level.

Mtap2 has also been associated with the formation of neurites at early developmental stages and with the dendritic scaffold on maturation (Harada et al., 2002). During neurite initiation, microtubules align to form a tight bundle, and actin filaments reorganize to produce a growth cone. The molecular mechanisms underlying this cytoskeleton reorganization are poorly known. Mtap2 binds both microtubules and F-actin and has been proposed as a candidate to play a key role in these rearrangements. Inactivation of Mtap2 promotes a reduction of dendrite length *in vitro* and *in vivo* (Sharma et al., 1994; Harada et al., 2002). However, TREK-1 expression has been reported to induce the formation of actin-rich protrusions, and its gene invalidation significantly alters the growth cone morphology of cultured embryonic striatal neurons (Lauritzen et al., 2005). TREK-1 and Mtap2 interaction may be involved in some of the coordinated cytoskeletal rearrangements controlling the transition from an undifferentiated state to neurite-bearing morphology.

Phosphorylation of Mtap2 affects its ability to bind and stabilize microtubule (Ozer and Halpain, 2000), but also to modulate TREK-1 expression level (Fig. 3). Neurotrophins such as BDNF prevent destabilization of the microtubule network and favor the microtubule-based transport of NMDA receptors to dendritic membrane (Yuen et al., 2005). It is also known that expression levels and distributions of Mtap2 can be affected by oxygen–glucose deprivation in adult hippocampal slices (Buddle et al., 2003). Therefore, regulation of NMDA receptors and TREK-1 background channels via Mtap2 phosphorylation states or expression levels potentially provides important mechanisms for regulating synaptic plasticity and associated learning and memory.

In conclusion, analysis of the native TREK channels has revealed that these channels use AKAP150 and Mtap2, two multifunctional proteins, as partners for their trafficking, addressing, and activity regulation in the brain. These proteins are scaffolding proteins that put TREKs at the center of complex protein networks (Fig. 8). Depending on brain localization and the nature of the expressed proteins, a large number of dynamic signaling complexes can be formed around TREK-1 and they are expected to play important roles in normal and pathological brain functions.



## References

- Al-Bassam J, Ozer RS, Safer D, Halpain S, Milligan RA (2002) MAP2 and tau bind longitudinally along the outer ridges of microtubule protofilaments. *J Cell Biol* 157:1187–1196.
- Alloui A, Zimmermann K, Mamet J, Duprat F, Noël J, Chemin J, Guy N, Blondeau N, Voilley N, Rubat-Coudert C, Borsotto M, Romey G, Heurteaux C, Reeh P, Eschalier A, Lazdunski M (2006) TREK-1, a K<sup>+</sup> channel involved in polymodal pain perception. *EMBO J* 25:2368–2376.
- Bang H, Kim Y, Kim D (2000) TREK-2, a new member of the mechanosensitive tandem-pore K<sup>+</sup> channel family. *J Biol Chem* 275:17412–17419.
- Bearzatto B, Lesage F, Reyes R, Lazdunski M, Laduron PM (2000) Axonal transport of TREK and TRAAK potassium channels in rat sciatic nerves. *Neuroreport* 11:927–930.
- Buddle M, Eberhardt E, Ciminello LH, Levin T, Wing R, DiPasquale K, Raley-Susman KM (2003) Microtubule-associated protein 2 (MAP2) associates with the NMDA receptor and is spatially redistributed within rat hippocampal neurons after oxygen-glucose deprivation. *Brain Res* 978:38–50.
- Burack MA, Silverman MA, Banker G (2000) The role of selective transport in neuronal protein sorting. *Neuron* 26:465–472.
- Cáceres A, Payne MR, Binder LI, Steward O (1983) Immunocytochemical localization of actin and microtubule-associated protein MAP2 in dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:1738–1742.
- Cáceres A, Banker GA, Binder L (1986) Immunocytochemical localization of tubulin and microtubule-associated protein 2 during the development of hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 6:714–722.
- Chemin J, Patel AJ, Duprat F, Lauritzen I, Lazdunski M, Honoré E (2005) A phospholipid sensor controls mechanogating of the K<sup>+</sup> channel TREK-1. *EMBO J* 24:44–53.
- Cornet V, Bichet D, Sandoz G, Marty I, Brocard J, Bourinet E, Mori Y, Villaz M, De Waard M (2002) Multiple determinants in voltage-dependent P/Q calcium channels control their retention in the endoplasmic reticulum. *Eur J Neurosci* 16:883–895.
- Davare MA, Dong F, Rubin CS, Hell JW (1999) The A-kinase anchor protein MAP2B and cAMP-dependent protein kinase are associated with class C L-type calcium channels in neurons. *J Biol Chem* 274:30280–30287.
- Decressac S, Franco M, Bendahhou S, Warth R, Knauer S, Barhanin J, Lazdunski M, Lesage F (2004) ARF6-dependent interaction of the TWIK1 K<sup>+</sup> channel with EFA6, a GDP/GTP exchange factor for ARF6. *EMBO Rep* 5:1171–1175.
- Dehmelt L, Halpain S (2005) The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol* 6:204.
- Duprat F, Lesage F, Patel AJ, Fink M, Romey G, Lazdunski M (2000) The neuroprotective agent riluzole activates the two P domain K<sup>+</sup> channels TREK-1 and TRAAK. *Mol Pharmacol* 57:906–912.
- Felgner H, Frank R, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E, Ludin B, Matus A, Schliwa M (1997) Domains of neuronal microtubule-associated proteins and flexural rigidity of microtubules. *J Cell Biol* 138:1067–1075.
- Fink M, Duprat F, Lesage F, Reyes R, Romey G, Heurteaux C, Lazdunski M (1996) Cloning, functional expression and brain localization of a novel unconventional outward rectifier K<sup>+</sup> channel. *EMBO J* 15:6854–6862.
- Fink M, Lesage F, Duprat F, Heurteaux C, Reyes R, Fosset M, Lazdunski M (1998) A neuronal two P domain K<sup>+</sup> channel stimulated by arachidonic acid and polyunsaturated fatty acids. *EMBO J* 17:3297–3308.
- Gamblin TC, Nachmanoff K, Halpain S, Williams RC Jr (1996) Recombinant microtubule-associated protein 2c reduces the dynamic instability of individual microtubules. *Biochemistry* 35:12576–12586.
- Goldstein LS, Yang Z (2000) Microtubule-based transport systems in neurons: the roles of kinesins and dyneins. *Annu Rev Neurosci* 23:39–71.
- Harada A, Teng J, Takei Y, Oguchi K, Hirokawa N (2002) MAP2 is required for dendrite elongation, PKA anchoring in dendrites, and proper PKA signal transduction. *J Cell Biol* 158:541–549.
- Heurteaux C, Guy N, Laigle C, Blondeau N, Duprat F, Mazzuca M, Lang-Lazdunski L, Widmann C, Zanzouri M, Romey G, Lazdunski M (2004) TREK-1, a K<sup>+</sup> channel involved in neuroprotection and general anesthesia. *EMBO J* 23:2684–2695.
- Heurteaux C, Lucas G, Guy N, El Yacoubi M, Thümmel S, Peng XD, Noble F, Blondeau N, Widmann C, Borsotto M, Gobbi G, Vaugeois JM, Debonnel G, Lazdunski M (2006) Deletion of the background potassium channel TREK-1 results in a depression-resistant phenotype. *Nat Neurosci* 9:1134–1141.
- Husi H, Ward MA, Choudhary JS, Blackstock WP, Grant SG (2000) Proteomic analysis of NMDA receptor-adhesion protein signaling complexes. *Nat Neurosci* 3:661–669.
- Kashina AS, Semenova IV, Ivanov PA, Potekhina ES, Zaliapin I, Rodionov VI (2004) Protein kinase A, which regulates intracellular transport, forms complexes with molecular motors on organelles. *Curr Biol* 14:1877–1881.
- Langnaese K, Seidenbecher C, Wex H, Seidel B, Hartung K, Appeltauer U, Garner A, Voss B, Mueller B, Garner CC, Gundelfinger ED (1996) Protein components of a rat brain synaptic junctional protein preparation. *Brain Res Mol Brain Res* 42:118–122.
- Lauritzen I, Chemin J, Honoré E, Jodar M, Guy N, Lazdunski M, Jane Patel A (2005) Cross-talk between the mechano-gated K2P channel TREK-1 and the actin cytoskeleton. *EMBO Rep* 6:642–648.
- Lein ES, Hawrylycz MJ, Ao N, Ayres M, Bensinger A, Bernard A, Boe AF, Boguski MS, Brockway KS, Byrnes EJ, Chen L, Chen L, Chen TM, Chin MC, Chong J, Crook BE, Czaplinska A, Dang CN, Datta S, Dee NR, et al. (2007) Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature* 445:168–176.
- Lesage F (2003) Pharmacology of neuronal background potassium channels. *Neuropharmacology* 44:1–7.
- Lesage F, Lazdunski M (2000) Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am J Physiol Renal Physiol* 279:F793–F801.
- Lesage F, Terrenoire C, Romey G, Lazdunski M (2000) Human TREK2, a 2P domain mechano-sensitive K<sup>+</sup> channel with multiple regulations by polyunsaturated fatty acids, lysophospholipids, and Gs, Gi, and Gq protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 275:28398–28405.
- Lewis SA, Wang DH, Cowan NJ (1988) Microtubule-associated protein MAP2 shares a microtubule binding motif with tau protein. *Science* 242:936–939.
- Lopes CM, Rohács T, Czirájk G, Balla T, Enyedi P, Logothetis DE (2005) PIP2 hydrolysis underlies agonist-induced inhibition and regulates voltage gating of two-pore domain K<sup>+</sup> channels. *J Physiol* 564:117–129.
- Maingret F, Patel AJ, Lesage F, Lazdunski M, Honoré E (1999) Mechano- or acid stimulation, two interactive modes of activation of the TREK-1 potassium channel. *J Biol Chem* 274:26691–26696.
- Maingret F, Patel AJ, Lesage F, Lazdunski M, Honoré E (2000a) Lysophospholipids open the two-pore domain mechano-gated K<sup>+</sup> channels TREK-1 and TRAAK. *J Biol Chem* 275:10128–10133.
- Maingret F, Lauritzen I, Patel AJ, Heurteaux C, Reyes R, Lesage F, Lazdunski M, Honoré E (2000b) TREK-1 is a heat-activated background K<sup>+</sup> channel. *EMBO J* 19:2483–2491.
- Obar RA, Dings J, Bayley H, Vallee RB (1989) The RII subunit of cAMP-dependent protein kinase binds to a common amino-terminal domain in microtubule-associated proteins 2A, 2B, and 2C. *Neuron* 3:639–645.
- Ozer RS, Halpain S (2000) Phosphorylation-dependent localization of microtubule-associated protein MAP2c to the actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell* 11:3573–3587.
- Patel AJ, Honoré E, Maingret F, Lesage F, Fink M, Duprat F, Lazdunski M (1998) A mammalian two pore domain mechano-gated S-like K<sup>+</sup> channel. *EMBO J* 17:4283–4290.
- Patel AJ, Honoré E, Lesage F, Fink M, Romey G, Lazdunski M (1999) Inhalational anesthetics activate two-pore-domain background K<sup>+</sup> channels. *Nat Neurosci* 2:422–426.
- Sandoz G, Thümmel S, Duprat F, Feliciangeli S, Vinh J, Escoubas P, Guy N, Lazdunski M, Lesage F (2006) AKAP150, a switch to convert mechano-, pH- and arachidonic acid-sensitive TREK K<sup>+</sup> channels into open leak channels. *EMBO J* 25:5864–5872.
- Sharma N, Kress Y, Shafit-Zagardo B (1994) Antisense MAP-2 oligonucleotides induce changes in microtubule assembly and neurite elongation in pre-existing neurites of rat cortical neurons. *Cell Motil Cytoskeleton* 27:234–247.
- Talley EM, Solorzano G, Lei Q, Kim D, Bayliss DA (2001) CNS distribution of members of the two-pore-domain (KCNK) potassium channel family. *J Neurosci* 21:7491–7505.
- Westphalen RI, Krivitski M, Amarosa A, Guy N, Hemmings HC Jr (2007) Reduced inhibition of cortical glutamate and GABA release by halothane in mice lacking the K<sup>+</sup> channel, TREK-1. *Br J Pharmacol* 152:939–945.
- Yuen EY, Jiang Q, Feng J, Yan Z (2005) Microtubule regulation of N-methyl-D-aspartate receptor channels in neurons. *J Biol Chem* 280:29420–29427.



Les courants générés par les canaux TREK sont régulés par de nombreux stimuli physiques, chimiques ou encore mécanique. Désormais, nous savons qu'ils sont également régulés par des protéines partenaires : AKAP-150, une protéine d'échafaudage et Mtap2, une protéine liée aux microtubules. A la différence d'AKAP-150 qui augmente les courants en agissant directement sur le canal et en modifiant ses propriétés électrophysiologiques, Mtap2 augmente les courants en agissant sur le cytosquelette et en augmentant ainsi la quantité de canaux exprimés à la membrane plasmique. Les deux protéines interagissent toutes deux sur l'extrémité C-terminale des canaux, et peuvent être liées en même temps sur la sous-unité. Leurs effets sont d'ailleurs cumulatifs.

La façon dont Mtap2 influence l'adressage des canaux TREK à la membrane plasmique n'est pas connue, mais nous savons que les microtubules sont une structure dynamique du cytosquelette qui forme des rails le long desquels circulent des vésicules responsables du trafic et de l'adressage spécifique des protéines. C'est notamment le cas des protéines membranaires qui circulent dans le cytoplasme des cellules *via* des protéines dites cargos associées aux microtubules. De nombreuses protéines gravitent autour de ces microtubules, certaines sont des protéines motrices dont le rôle est de faire avancer les vésicules de transport le long de ces rails, ce sont par exemple les dynéines et les kinésines (pour revue (Goldstein and Yang, 2000)). Une autre famille de protéine, les MAP (Microtubule Associated Proteins) à laquelle Mtap2 appartient sont associées aux microtubules. Elles ne sont pas nécessaires à l'assemblage des microtubules ou au transport des vésicules, mais elles interviennent dans la dynamique d'assemblage des microtubules (Gamblin *et al.*, 1996; Al-Bassam *et al.*, 2002). En augmentant la stabilité des microtubules, Mtap2 pourrait augmenter l'adressage des canaux TREK à la membrane plasmique. Cependant cet effet n'a pas été observé pour les autres canaux de cette sous-famille, il semble donc que l'interaction physique entre Mtap2 et le canal soit nécessaire pour favoriser l'insertion de la sous-unité canal dans la membrane plasmique.

Nous avons vu que Mtap2 peut interagir avec la PKA, or l'activité de la PKA contrôle l'activité des protéines motrices associées aux microtubules. Nous avançons donc l'hypothèse que l'interaction de Mtap2 avec les sous-unités TREK au cours de leur transport permet de placer à proximité la protéine kinase A et ainsi améliorer le transport de ces protéines vers la membrane plasmique.

Le rôle de cette interaction pourrait reposer sur la régionalisation des différentes isoformes des protéines associées aux microtubules, qui permettraient d'adresser de façon spécifique les protéines auxquelles elles sont associées. Par exemple, Mtap2 est exprimée dans les dendrites, les épines dendritiques et les densités post-synaptiques. L'une des fonctions de cette interaction pourrait alors être d'adresser les canaux TREK dans ces





domaines subcellulaires précis. De plus, Mtap2 a également été décrite comme une protéine d'échafaudage capable de lier PKA, mais aussi d'autres kinases, telles que Src, Grb2 et Fyn ou d'autres canaux ioniques ou récepteurs (Dehmelt and Halpain, 2005). Ainsi, Mtap2 permettrait de placer les canaux TREK au centre d'un complexe protéique post-synaptique comprenant des éléments du cytosquelette, des canaux ioniques, des récepteurs aux neurotransmetteurs et des protéines régulatrices.

La localisation de Mtap2 change au cours du développement neuronal, pouvant alors entraîner la modification de la localisation des canaux TREK. Mtap2 est présente dans les axones et les cônes de croissance des neurones en développement, alors qu'elle est retrouvée dans le compartiment somatodendritique des neurones matures. La présence des canaux TREK dans certains compartiments subcellulaires, notamment le cône de croissance ou les densités post-synaptiques, peut profondément modifier la physiologie et la réponse de la cellule à certains stimuli. Mtap2 peut donc d'une part aider l'insertion des canaux TREK dans la membrane plasmique, et d'autre part permettre leur maintien dans des compartiments subcellulaires précis et ceci en fonction du stade de développement des neurones.

Mtap2 est également impliquée dans la formation des dendrites, or nous savons que TREK1 interagit également avec le cytosquelette et favorise la formation de replis riches en actine dans les cellules en culture ou la formation de pseudo-dendrites dans les neurones en culture. Ces deux protéines pourraient donc intervenir dans les réarrangements du cytosquelette qui contrôlent la transition entre le stade indifférencié et le stade de développement des neurites.

Cette étude a donc permis de montrer que les canaux TREK peuvent interagir avec plusieurs protéines partenaires, simultanément ou non. Ces protéines partenaires sont neuronales et interviennent dans divers processus cellulaires. Dans le cadre de leur interaction avec les canaux TREK, elles participent au trafic intracellulaire, à l'adressage ou encore à la régulation de l'activité de ces canaux dans le cerveau. Ces protéines sont des protéines d'échafaudage qui placent les canaux TREK au centre de complexes protéiques où sont présent des canaux ioniques, des récepteurs aux neurotransmetteurs, des protéines kinases régulatrices... Les protéines exprimées dans les différentes structures cérébrales et dans les différents domaines subcellulaires étant différentes, l'environnement protéique des canaux TREK sera donc différent. Un même canal pourra donc avoir des régulations, une expression et une activité différentes en fonction des zones considérées, augmentant ainsi la diversité des courants qu'il est capable de générer.



### III.2 LE SILENCE DU CANAL TWIK1 EST EXPLIQUE PAR SON ENDOCYTOSE CONSTITUTIVE ET SA SEQUESTRATION (**ARTICLE 2**)

Comme nous l'avons vu précédemment, le canal TWIK1 ne produit pas ou très peu de courants quand il est exprimé dans un système d'expression hétérologue. L'explication qui avait été avancée était l'interaction du canal avec une protéine cytosolique, la protéine SUMO. Cette étude publiée en 2005 indiquait que le canal était en permanence inhibé par la liaison de cette protéine au niveau de la membrane plasmique (Rajan *et al.*, 2005). En 2007, le laboratoire a démontré que l'absence de courant TWIK1 n'était pas due à la sumoylation (Feliciangeli *et al.*, 2007). Cependant, le mécanisme responsable de ce silence n'était toujours pas élucidé. Nous avons donc cherché à comprendre le comportement atypique de ce canal par des expériences de biologie cellulaire, menées par le Dr Sylvain Feliciangeli, et d'électrophysiologie que j'ai réalisées.

La première étape a été de déterminer la localisation subcellulaire de la sous-unité TWIK1. Pour cela des expériences de microscopie confocale et électronique ont été réalisées dans des cellules MDCK, qui sont des cellules épithéliales de néphron de chien. Nous avons ainsi pu voir que dans les cellules non polarisées, le canal est retenu dans un compartiment intracellulaire riche en protéine Vamp8. Ce compartiment est périnucléaire et correspond aux endosomes de recyclage. Dans les cellules polarisées, TWIK1 est localisé dans un compartiment de recyclage subapical. Les images obtenues en microscopie électronique ont confirmé que le canal TWIK1 est très peu retrouvé au niveau de la membrane plasmique, mais est principalement détecté juste en dessous de la bordure en brosse apicale, expliquant les très faibles quantités de courants enregistrés dans ces cellules.

En général, la rétention d'une protéine dans un compartiment intracellulaire est induite par un signal présent sur la séquence de cette protéine, signal d'endocytose, de rétention dans le réticulum endoplasmique, d'export vers les lysosomes...

Afin d'identifier le motif responsable de cet adressage particulier de TWIK1, le Dr Sylvain Feliciangeli a effectué des délétions progressives de l'extrémité C-terminale du canal, et nous avons trouvé une séquence de six acides aminés importante pour l'expression membranaire du canal. De façon intéressante, ce segment renferme deux résidus isoleucines adjacents (Ile293 et Ile294). Ce doublet est proche d'un signal d'internalisation connu et composé de deux résidus leucines adjacents. De tels motifs dileucine favorisent l'endocytose en formant un pont entre la protéine membranaire et la machinerie vésiculaire, en recrutant notamment des protéines du manteau comme la clathrine (Bonifacino and Traub, 2003).



En ce qui concerne la sous-unité TWIK1, la mutation de ces deux résidus isoleucines en alanines provoque une modification importante de l'adressage du canal, puisque ce mutant est retrouvé à la membrane plasmique et est capable de générer des courants dans les systèmes d'expression hétérologue. Nous avons ainsi montré que les canaux TWIK1 sont fonctionnels, capables de produire des courants et que ceux-ci présentent une inactivation très rapide. L'ajout de l'extrémité C-terminale de TWIK1 au canal TASK3, présent à la membrane plasmique, entraîne sa rétention dans un compartiment intracellulaire. La mutation du motif diisoleucine en alanine (TASK3CtTWIK1I293A,I294A) permet alors de restaurer l'expression membranaire de cette chimère.

La question qui s'est immédiatement posée à la vue des ces résultats était de savoir quel était le parcours et les étapes de l'adressage du canal TWIK1. En effet, deux hypothèses peuvent expliquer la localisation de TWIK1 dans le compartiment subapical de recyclage. Cet adressage peut être direct, c'est-à-dire qu'avant son insertion à la membrane plasmique, il est retenu dans ce compartiment. La seconde hypothèse repose sur le fait que le canal est inséré dans la membrane plasmique après sa synthèse mais qu'il est très vite endocyté et adressé dans ces endosomes de recyclage. Des expériences d'internalisation ont montré que le canal TWIK1 est inséré dans la membrane plasmique avant de subir très rapidement une endocytose dépendante de la dynamine. Au cours de ces expériences, le Dr Sylvain Feliciangeli a pu observer que les canaux sont transférés dans des vésicules intracellulaires 5 à 10 minutes après leur insertion dans la membrane plasmique.

La difficulté d'enregistrer les courants TWIK1 provient donc de son internalisation rapide et de sa rétention dans un compartiment de recyclage situé sous la membrane plasmique. Nous avons alors cherché le signal physiologique stimulant la sortie du canal TWIK1 de ce compartiment pour lui permettre de s'insérer dans la membrane plasmique et de produire des courants. J'ai montré que l'application de sérotonine sur les cellules possédant le récepteur 5-HT<sub>1</sub>R entraîne une augmentation des courants dans les cellules exprimant TWIK1 mais pas dans celles qui ne l'expriment pas. De plus l'application de sérotonine n'a pas ou peu d'effets sur les cellules exprimant le mutant de TWIK1 TWIK1<sub>I293A,I294A</sub>. La liaison de la sérotonine sur son récepteur 5-HT<sub>1</sub>R active la protéine G<sub>i</sub>, qui a pour rôle de diminuer la concentration d'AMPc. Il semble que ce soit la diminution de la concentration d'AMPc qui soit nécessaire pour stimuler l'insertion du canal dans la membrane plasmique. Cela est confirmé par le fait qu'une activation des récepteurs α2-AR couplés à la protéine G<sub>i</sub> entraîne également une augmentation des courants TWIK1.



## Article 2

**Potassium channel silencing by constitutive endocytosis and intercellular sequestration.**

Feliciangeli S., **Tardy M.**, Sandoz G., Chatelain F., Warth R., Barhanin J., Bendahhou S. and Lesage F.

**The journal of Biological chemistry**, February 12, 2010, Vol. 285, NO.7, pp. 4798-4805.





# Potassium Channel Silencing by Constitutive Endocytosis and Intracellular Sequestration<sup>\*§</sup>

Received for publication, October 28, 2009, and in revised form, November 30, 2009. Published, JBC Papers in Press, December 3, 2009, DOI 10.1074/jbc.M109.078535

Sylvain Feliciangeli<sup>‡</sup>, Magalie P. Tardy<sup>‡</sup>, Guillaume Sandoz<sup>‡</sup>, Franck C. Chatelain<sup>‡</sup>, Richard Warth<sup>§</sup>, Jacques Barhanin<sup>¶</sup>, Saïd Bendahhou<sup>¶</sup>, and Florian Lesage<sup>‡1</sup>

From the <sup>‡</sup>Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS, and Université de Nice Sophia-Antipolis, Sophia-Antipolis, 06560 Valbonne, France, the <sup>§</sup>Institute of Physiology, University of Regensburg, 93053 Regensburg, Germany, and <sup>¶</sup>Transport Ionique Aspects Normaux et Pathologiques (TIANP), CNRS, and Université de Nice Sophia-Antipolis, 06103 Nice Cedex 2, France

Tandem of P domains in a weak inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel 1 (TWIK1) is a K<sup>+</sup> channel that produces unusually low levels of current. Replacement of lysine 274 by a glutamic acid (K274E) is associated with stronger currents. This mutation would prevent conjugation of a small ubiquitin modifier peptide to Lys-274, a mechanism proposed to be responsible for channel silencing. However, we found no biochemical evidence of TWIK1 sumoylation, and we showed that the conservative change K274R did not increase current, suggesting that K274E modifies TWIK1 gating through a charge effect. Now we rule out an eventual effect of K274E on TWIK1 trafficking, and we provide convincing evidence that TWIK1 silencing results from its rapid retrieval from the cell surface. TWIK1 is internalized via a dynamin-dependent mechanism and addressed to the recycling endosomal compartment. Mutation of a diisoleucine repeat located in its cytoplasmic C terminus (I293A,I294A) stabilizes TWIK1 at the plasma membrane, resulting in robust currents. The effects of I293A,I294A on channel trafficking and of K274E on channel activity are cumulative, promoting even more currents. Activation of serotonergic receptor 5-HT<sub>1</sub>R or adrenoceptor  $\alpha$ 2A-AR stimulates TWIK1 but has no effect on TWIK1I293A,I294A, suggesting that G<sub>i</sub> protein activation is a physiological signal for increasing the number of active channels at the plasma membrane.

TWIK1<sup>2</sup> (KCNK1, K2P1) has been cloned from human kidney (1). It has four membrane-spanning segments (M1–M4) and two pore-forming loops (P1 and P2) and forms covalent homodimers (2). Following the characterization of TWIK1, related two-P domain K<sup>+</sup> (K<sub>2P</sub>) channels were isolated from *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans*, and mammals (3–7). Fifteen related genes are present in the human genome. K<sub>2P</sub> channels produce background K<sup>+</sup> currents modulated by a large

variety of physical (temperature, membrane stretch) and chemical (pH, polyunsaturated fatty acids, phospholipids, hormones, and neurotransmitters) stimuli. Gene inactivation has revealed the implication of different K<sub>2P</sub> channels in a variety of physiological and pathophysiological functions, including cell volume regulation (8), bicarbonate transport and proximal renal tubular acidosis (9), cerebellar excitability and altered motor performance (10), adrenal gland development and primary aldosteronism (11), polyunsaturated fatty acid-mediated neuroprotection (12), sensitivity to volatile anesthetics (12), perception of pain (13), and mood control (14).

Among K<sub>2P</sub> channels, TWIK1 displays several unique features. Like its closest homolog TWIK2 (KCNK6, K2P6) (15), it produces currents with a rapidly inactivating component. Because of this inactivation, their steady-state current-voltage relationships are much more similar to that of the weak inwardly rectifying ROMK1 current (1) than those of TASK K<sub>2P</sub> currents that follow the Goldman-Hodgkin-Katz equation (16). Another unique feature of TWIK1 is its low level of functional expression. In *Xenopus* oocytes, only modest currents are induced despite the high amount of injected cRNA. In transfected mammalian cells, TWIK1 does not produce measurable currents. How can this failure of TWIK1 to produce currents be explained? A first hypothesis is that TWIK1 channels are expressed at the cell surface but silenced. A silencing mechanism recently proposed is the conjugation of a small ubiquitin modifier (SUMO) peptide to lysine 274. In *Xenopus* oocytes, substitution of lysine 274 by a glutamic acid residue that cannot be used for sumoylation gives rise to robust current expression (17). This work has first gained considerable interest not only because it identified a novel mechanism of ion channel regulation, but also for its general implication in cell biology (18). However, when we analyzed the problem ourselves, we failed to observe any biochemical evidence supporting TWIK1 sumoylation in oocytes, in mammalian cells, or even *in vitro*. Furthermore, we did not observe any current increase by changing lysine 274 to arginine, a substitution that should have also prevented sumoylation and silencing of the channel. We concluded that the increase of current associated with K274E, and which is absent in K274R, could probably be attributed to a charge effect modifying the TWIK1 gating and that SUMO conjugation at lysine 274 does not underlie TWIK1 silencing (19).

Here, we further explore an alternative hypothesis for TWIK1 silencing: TWIK1 is a functional channel but is not preferentially expressed at the plasma membrane. We have

<sup>\*</sup> This work was supported by the Fondation pour la Recherche Médicale (Equipe labellisée F. L.).

<sup>§</sup> The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Fig. 1.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed: IPMC CNRS, 660 route des Lucioles, Sophia-Antipolis, 06560 Valbonne, France. Fax: 33493957704; E-mail: lesage@ipmc.cnrs.fr.

<sup>2</sup> The abbreviations used are: TWIK1, tandem of P domains in a weak inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel 1; K<sub>2P</sub> channel, two-P domain K<sup>+</sup> channel; HA, hemagglutinin; 5-HT, 5-hydroxytryptamine; 5-HT<sub>1</sub>R, 5-HT<sub>1</sub> receptor; MDCK, Madin-Darby canine kidney; pF, picofarad; GFP, green fluorescent protein; TREK1, TWIK-related K<sup>+</sup> channel 1.



shown previously that TWIK1 is present mainly in the subapical recycling endosomal compartment in native proximal tubule cells in the kidney and in cultured polarized cells (20). In a variety of nonpolarized cells, TWIK1 was detected almost exclusively in the corresponding pericentriolar recycling compartment (20). In this article, we provide new data on the mechanisms that control this surface expression/retrieval of TWIK1. We show that TWIK1 contains a diisoleucine-based motif required for its rapid endocytosis. We also provide evidence for a  $G_i$ -dependent stabilization of TWIK1 at the cell surface.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Antibodies and Reagents**—Rabbit anti-TWIK1 polyclonal antibodies have already been described (2). Goat anti-TWIK1 polyclonal antibody (clone V-20) was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Mouse anti-HA monoclonal antibody (clone HA.7) and chemicals, including clonidine and 5-hydroxytryptamine (5-HT), were purchased from Sigma-Aldrich.

**Molecular Biology**—The HA tag was added in-frame at the 5' end of the human TWIK1 sequence by PCR. The amplification product was inserted into the EcoRI/BamHI sites of pCI-iresCD8 (21). Deletions were performed by PCR using oligonucleotides introducing a stop codon followed by a BamHI restriction site. Point mutations and chimeras were obtained by PCR using standard procedures.

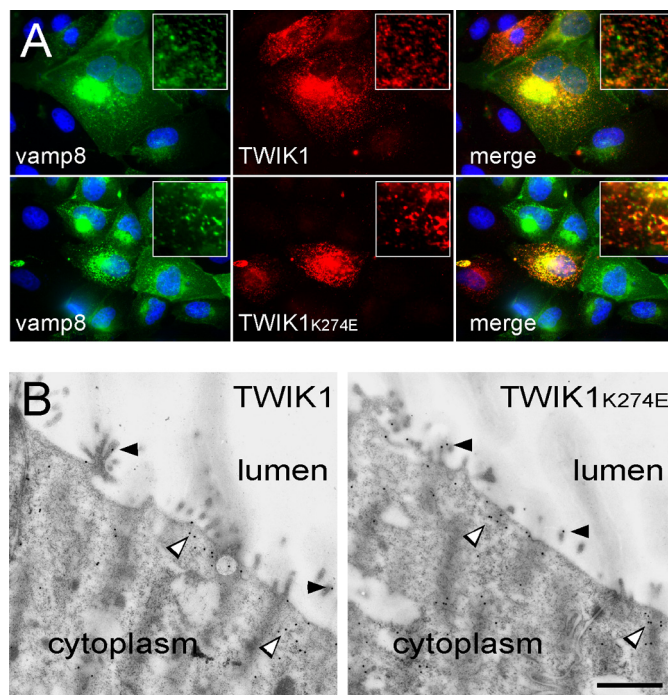
**Cell Culture and Electrophysiology**—Protocols for COS and Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell cultures, transient transfection, and development of stable cell lines were described earlier (20). *Xenopus* oocyte preparation and injection, and oocyte and cell electrophysiological recordings were performed as described previously (19).

**Electron Microscopy and Immunocytochemistry**—Cells were fixed with 4% formaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, rinsed in the same buffer, and embedded in gelatin (22) before partial dehydration with ethanol and final embedding in LR White resin (23). Immunocytochemistry was performed as described previously (22), by using affinity-purified polyclonal antibodies directed against TWIK1 diluted 1:200. Quantification of colloidal gold density along the boundary of cells was carried out as described (24). F-actin was labeled with phalloidin coupled to Alexa Fluor 647 (Invitrogen). Immunocytochemistry on MDCK cells was performed as described previously (19).

**Biochemistry**—For cell surface quantification experiments, cells were plated in 12-well dishes and transfected with pCI-CD8 empty or containing sequences encoding either wild type or I293,294A mutant of TASK3-HA/TWIK1 chimera. Forty-eight h after transfection, cells were incubated in complete growth medium containing anti-HA antibody (1:200 dilution). After 2 h, cells were washed, and channel-antibody complexes were detected using secondary goat anti-mouse antibodies coupled with horseradish peroxidase and ECL substrate (Thermo). Luminescence was quantified by using a Luminoskan Ascent from Thermo.

## RESULTS

**Mutation K274E Has No Effect on TWIK1 Trafficking**—We have shown previously that in transfected mammalian cells TWIK1 produced currents only when fused to the HcRed pro-



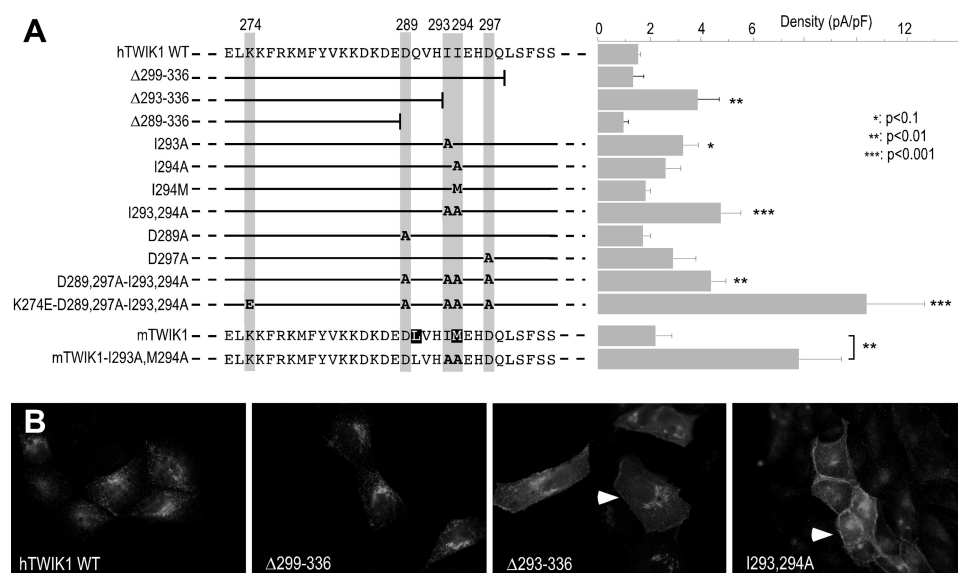
**FIGURE 1. K274E does not affect TWIK1 distribution in transfected MDCK cells.** *A*, nonpolarized cells co-expressing GFP-Vamp8 and TWIK1 or TWIK1K274E. Overlapping red and green labeling is in yellow in the merge panels. Nuclei are in blue. Insets represent magnification of the perinuclear staining. *B*, immunolocalization of TWIK1 by electron microscopy in polarized cells. Open and filled arrowheads show immunogold labeling, respectively, inside the cell and at the plasma membrane. Scale bar, 200 nm.

tein (20). We used this strategy to produce functional TWIK1K274E channels and to show the stimulatory effect of the K274E substitution (19). However, we did not check the effect of this mutation on TWIK1 trafficking. Intracellular distributions of TWIK1 and TWIK1K274E were evaluated in stably transfected MDCK cells by fluorescence and electron microscopy (Fig. 1). MDCK cells are epithelial cells of nephric tubule origin that form confluent monolayers of polarized cells on porous membranes. As reported previously, in nonpolarized cells TWIK1 was detected in the same intracellular compartment as Vamp8, a marker of the pericentriolar and vesiculotubular compartment corresponding to recycling endosomes (Fig. 1*A*). This endosomal compartment is located distal to early endosomes and is not related to the late endosomal/lysosomal degradation pathway. No significant surface staining of TWIK1 could be observed. In kidney proximal tubule cells, TWIK1 is localized to the subapical recycling compartment, a compartment corresponding to the pericentriolar recycling compartment in nonpolarized cells. Electron microscopy from polarized MDCK cells shows that TWIK1 is present mainly underneath the apical brush border with only a few immunogold particles found at a position corresponding to the plasma membrane (Fig. 1*B*). Mutation K274E has no effect on TWIK1 distribution in nonpolarized or polarized MDCK cells. TWIK1K274E was detected in the same Vamp8-positive compartment as TWIK1 (Fig. 1*A*). In polarized cells, quantification by electron microscopy confirms that the density of TWIK1K274E detected at the plasma membrane is not significantly different from that of TWIK1 (Fig. 1*B*). A comparison of





## TWIK1 Trafficking Rules Its Functional Expression



**FIGURE 2. Diisoleucine motif controls functional expression and distribution of TWIK1.** *A*, left, sequence of a portion of the C-terminal domain of TWIK1 that contains the diisoleucine doublet, and schematic representation of the mutants. Mutated residues are in **bold**. *Right*, current recorded at +40 mV in transfected COS-7 cells ( $n = 3-5$ ). *B*, immunolocalization in MDCK-transfected cells.

the channels present at the surface was obtained by counting the number of gold particles along the ciliated apical plasma membrane. For cells expressing TWIK1, the value is 36 particles along 76.7  $\mu\text{m}$  of membrane, *i.e.* 2.13 particles/ $\mu\text{m}$ , and it is 38 along 81.4  $\mu\text{m}$  (2.14 particles/ $\mu\text{m}$ ) for TWIK1K274E. This result demonstrates that mutation K274E has no effect on TWIK1 trafficking and gives more support to the hypothesis that K274E modifies channel activity by modifying TWIK1 gating.

**Identification of an Unconventional Dileucine-based Motif Involved in TWIK1 Silencing**—To identify a signal sequence involved in TWIK1 silencing, we designed a screening method based on a combination of mutagenesis, electrophysiology, and fluorescence microscopy. TWIK1 mutants were transiently expressed in COS-7, a fibroblast cell line well suited for electrophysiology. Whole cell currents were measured by voltage clamp at 0 mV (Fig. 2*A*, *right panel*). In parallel, TWIK1 mutants were transiently expressed and immunolabeled in MDCK cells that are more suitable than COS-7 for subcellular localization of membrane proteins (Fig. 2*B*). We progressively deleted the cytoplasmic C terminus of TWIK1 (Fig. 2*A*, *left panel*). Deletion of the last 37 residues ( $\Delta 299-336$ ) had no effect on intracellular retention (Fig. 2*B*). Recorded currents were not significantly different from those currents expressed by control COS-7 cells (Fig. 2*A*). Removing 6 additional residues ( $\Delta 293-336$ ) yielded a truncated mutant producing more current and immunostaining compatible with expression at the plasma membrane (Fig. 2, *A* and *B*). A more truncated channel ( $\Delta 289-336$ ) lost this current activity and was detected in endoplasmic reticulum, suggesting protein misfolding (data not shown). These results show that the sequence extending from residues 293 to 299 is important for functional expression of TWIK1 at the plasma membrane. Interestingly, this segment contains two adjacent isoleucines, Ile-293 and Ile-294. Such a doublet is reminiscent of the repeat present in so-called dileucine

signals of internalization. These motifs facilitate endocytosis by forming a link between membrane proteins and the vesicular budding machinery through interaction with adaptor proteins and recruitment of the clathrin coat protein (25). In TWIK1, substitution of these isoleucines by alanines is associated with channel relocalization to the plasma membrane and production of currents similar to those produced by mutant  $\Delta 293-336$ . Substitution of a single isoleucine has milder effect (Fig. 2*A*). In mouse TWIK1, one of the two isoleucines is not conserved. Ile-294 is replaced by a methionine. However, the silencing signal is conserved: mouse TWIK1I293A,M294A produces more current than mouse TWIK1 (Fig. 2*A*). Conversely, substitution of isoleucine 294 by methionine in human TWIK1 did not

alleviate silencing. These results demonstrate that these residues at position 294 are functionally equivalent and that the motif involved in TWIK1 silencing is functionally conserved in mouse and human.

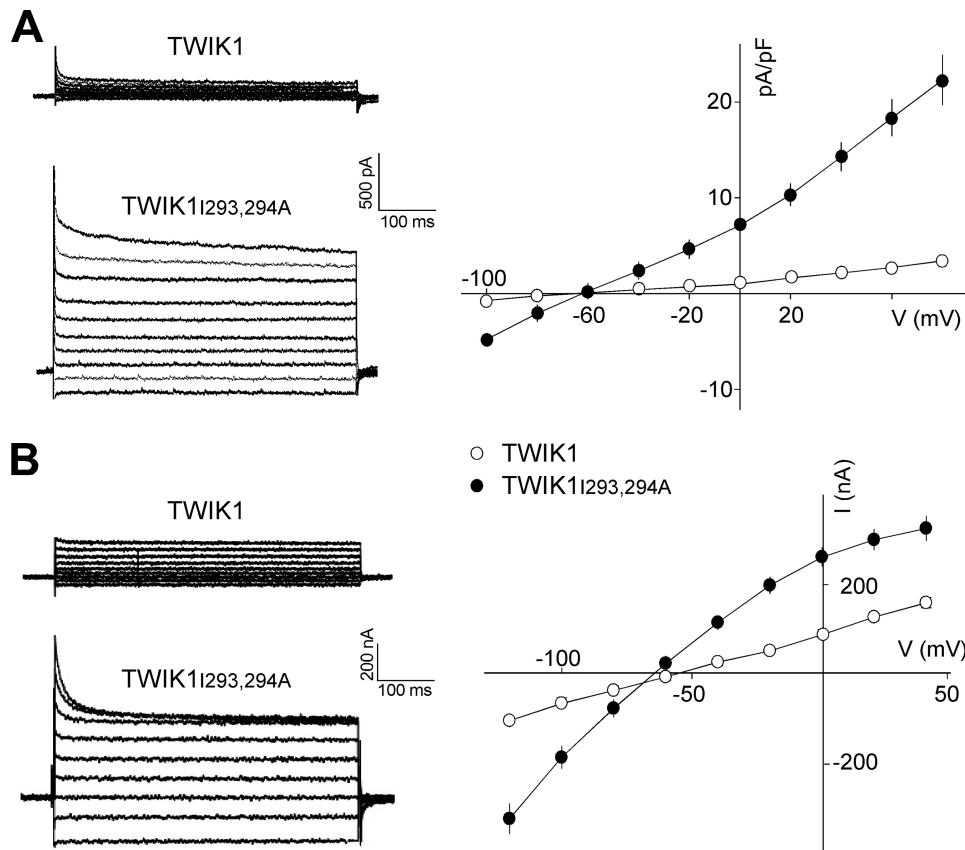
Dileucine-based motifs involved in endocytosis usually contain acidic residues at positions  $-4$  or  $+3$  of the leucine repeat. By affecting the spatial location of the dileucine repeat, these negatively charged residues are important for trafficking. We mutated aspartates Asp-289 and Asp-297 alone or in combination with I293,294A. Mutation D297A is associated with a current increase, but this change is not significant (Fig. 2*A*).

As reported previously (19) and in agreement with the fact that mutation K274E has no effect on TWIK1 trafficking (Fig. 1), TWIK1K274E does not produce currents in COS-7 cells. However, K274E is associated with a current increase when introduced into TWIK1I293A,I294A (or D289A,D297A-I293A,I294A as shown in Fig. 2*A*). This indicates that these mutations that increase respectively channel activity and channel density in the plasma membrane have additive effects.

**TWIK1I293A,I294A Is Expressed Mainly at the Plasma Membrane**—The importance of the diisoleucine repeat was verified and further characterized in stably transfected MDCK cells. Fig. 3*A* shows currents produced by TWIK1 and TWIK1I293A,I294A. They display a fast inactivation component as observed in *Xenopus* oocytes (Fig. 3*B*) and thoroughly characterized for the closely related channel TWIK2 (15). The kinetics of TWIK1 inactivation are extremely fast and overlap the membrane capacitive discharge associated with the voltage pulse. This fast inactivating peak current is clearly not a stimulation artifact and constitutes a hallmark of the TWIK currents. As observed in COS-7 (Fig. 2*A*) and MDCK (Fig. 3*A*) cells, TWIK1I293A,I294A produces larger currents than TWIK1 in oocytes (Fig. 3*B*). Next we compared subcellular distributions of TWIK1 and TWIK1I293A,I294A in nonpolarized and polarized cells. TWIK1I293A,I294A is found at the cell surface. Its immunolabel-



## TWIK1 Trafficking Rules Its Functional Expression



**FIGURE 3. Electrophysiological characterization of TWIK1 and TWIK1I293A,I294A in MDCK cells (A) and *Xenopus oocytes* (B).** *A left*, current traces recorded in MDCK cells during voltage pulses ranging from  $-100$  mV to  $+80$  mV in  $20$ -mV steps from a holding potential of  $-80$  mV. *Right*, current density was determined at all test potentials from the steady-state currents and the whole cell capacitance recorded as in the *left* panel. Each value is the mean  $\pm$  S.E.,  $n$  cells for TWIK1 ( $n = 10$ ), TWIK1I293A,I294A ( $n = 9$ ). *B left*, current traces recorded in *Xenopus oocytes* during voltage pulses ranging from  $-120$  mV to  $+40$  mV in  $20$ -mV steps from a holding potential of  $-80$  mV. *Right*, current-voltage relationships deduced from steady-state currents recorded as in the *left* panel. Each value is the mean  $\pm$  S.E.,  $n$  cells for TWIK1 ( $n = 29$ ), TWIK1I293A,I294A ( $n = 31$ ).

ing overlaps the submembraneous F-actin stained by fluorescein isothiocyanate-phalloidin (Fig. 4A). In polarized cells, we used confocal microscopy to discriminate apical and basolateral membranes (Fig. 4B). TWIK1 was detected exclusively below the actin-rich microvilli of the brush border (Fig. 4C). TWIK1I293A,I294A does not show this subapical localization. It has the same localization as actin in the basolateral membrane and in apical microvilli (Fig. 4D). These results confirm that the isoleucine repeat is responsible for the absence of TWIK1 at the cell surface. They also confirm that TWIK1 is a functional channel that produces measurable currents when it reaches the plasma membrane.

**The Diisoleucine-based Motif Can Be Transferred to Another  $K_{2P}$  Channel**—TASK3 is a  $K_{2P}$  channel expressed at the plasma membrane. A chimera TASK3CtTWIK1, in which the cytoplasmic C terminus of TASK3 is replaced by the cytoplasmic C terminus of TWIK1, has the same intracellular distribution as that of TWIK1 (supplemental Fig. 1A). It colocalizes with vamp8-GFP (not shown) demonstrating that TWIK1 sorting to recycling endosomes is conferred by its cytoplasmic C terminus. When the diisoleucine motif is mutated, the corresponding channel TASK3CtTWIK1I293A,I294A now reappears at the cell surface (supplemental Fig. 1A). The proportions of TASK3, TASK3CtTWIK1, and TASK3CtTWIK1I293A,I294A present at

the plasma membrane were quantified by taking advantage of a HA tag introduced in the extracellular M2P3 loop. Transfected cells were incubated in the presence of anti-HA antibody after fixation and permeabilization (total labeling) or on living cells kept at  $4^{\circ}\text{C}$  (cell surface labeling). HA tag-HA antibody complexes were detected using a secondary antibody coupled to horseradish peroxidase and quantified by luminescence (supplemental Fig. 1B). The results confirm that TASK3 and TASK3CtTWIK1I293A,I294A are present in similar proportions at the cell surface (respectively,  $41.5 \pm 18.6$  and  $66.1 \pm 12.2\%$ ,  $n = 3$ ), whereas TASK3CtTWIK1 is mostly intracellular ( $9.8 \pm 12.8\%$ ,  $n = 3$ ). Together, these results show that the cytoplasmic C terminus of TWIK1 constitutes a transferable cassette that contains all of the motifs required for targeting to recycling endosomal compartment. These results also show that the diisoleucine repeat prevents the stable expression of the protein at the plasma membrane.

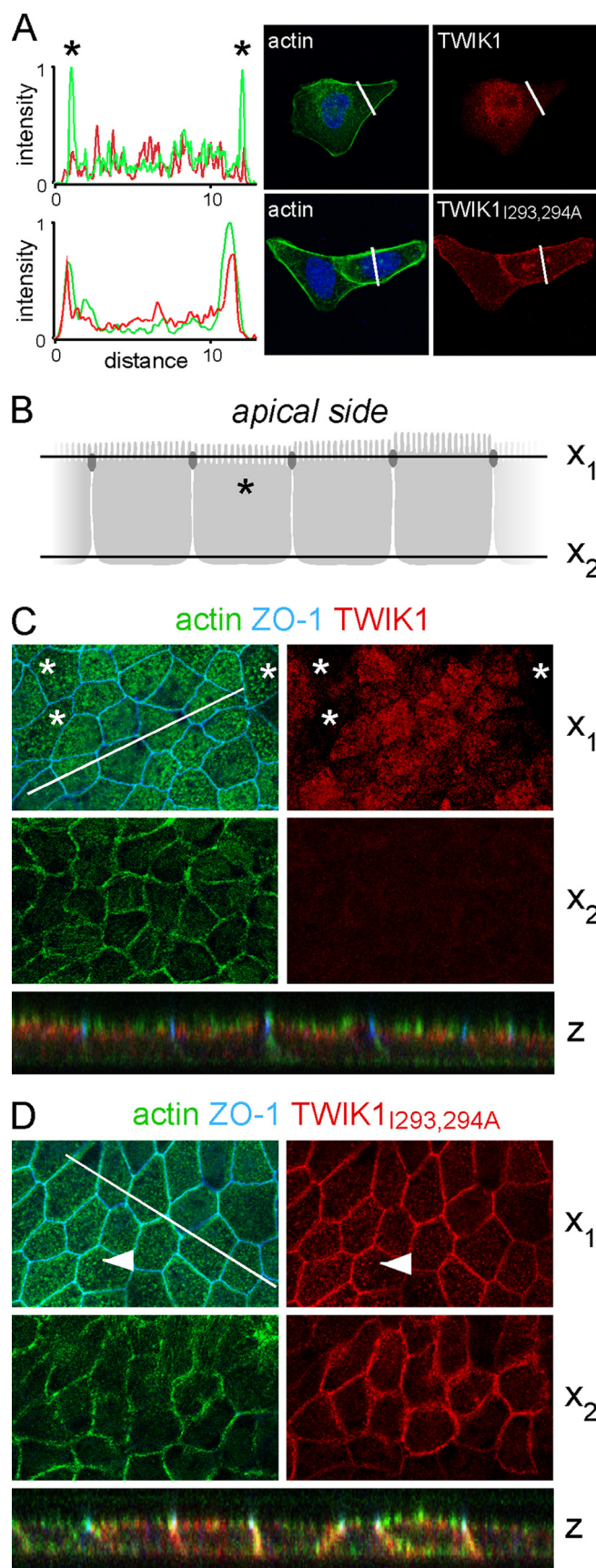
**TWIK1 Is Rapidly Internalized through a Dynamin-dependent Mechanism**—We next examined alternative hypotheses about TWIK1 traf-

ficking following biosynthesis: Either TWIK1 is directly sorted and addressed to the recycling endosomes, or it reaches the plasma membrane before being endocytosed and routed to the recycling compartment. In the latter case, the diisoleucine motif would constitute a strong signal for endocytosis. We investigated the TWIK1 dynamics at the cell surface. Transiently transfected MDCK cells expressing TWIK1 were incubated at  $4^{\circ}\text{C}$  with antibodies directed against its extracellular M1P1 loop (2). After washing, cells were incubated for various periods of time at  $37^{\circ}\text{C}$  before fixation and labeling of the TWIK1-antibody complexes (Fig. 5A). A diffuse staining at the cell surface was observed when cells were fixed directly after the  $4^{\circ}\text{C}$  incubation with the antibody (Fig. 5A, upper left panel). A 10-min incubation at  $37^{\circ}\text{C}$  induced a redistribution of the labeling into bright vesicles. Redistribution is already observed after 5 min (data not shown). Progressively, the staining evolved to give a punctate and perinuclear distribution at 60 min. Under the same conditions, TWIK1I293A,I294A gave a surface staining that was not modified by incubation at  $37^{\circ}\text{C}$  even after 60 min (Fig. 5A). Together, these results show that TWIK1 reaches the cell surface before being rapidly internalized and addressed to the recycling endosomal compartment. They also show that the diisoleucine-based motif controls TWIK1 endocytosis





## TWIK1 Trafficking Rules Its Functional Expression



**FIGURE 4. TWIK1 and TWIK1I293A,I294A distributions in stably transfected MDCK cells.** *A*, immunolocalization in nonpolarized cells. Cell nuclei are in blue. Actin is labeled with fluorescein isothiocyanate-phalloidin. *Left*,

from the cell surface. Previously, we have shown that overexpression of TWIK1 was able to inhibit clathrin-dependent internalization of the transferrin receptor suggesting a link between clathrin-dependent endocytosis and TWIK1 (20). We co-expressed TWIK1 with a dominant negative mutant of dynamin I (dynaminK44A) that is known to block clathrin-mediated endocytosis (26, 27). Fig. 5*B* shows that expression of dynaminK44A, but not dynamin, induces a partial redistribution of TWIK1 to the cell surface. This relocation is correlated with a higher density of current (Fig. 5*C*). The effect of dynaminK44A is always more drastic in MDCK cells transiently expressing TWIK1 compared with MDCK cells stably expressing TWIK1 (data not shown). This suggests that dynaminK44A affects neosynthesized channels present at the plasma membrane and promotes their accumulation in this location.

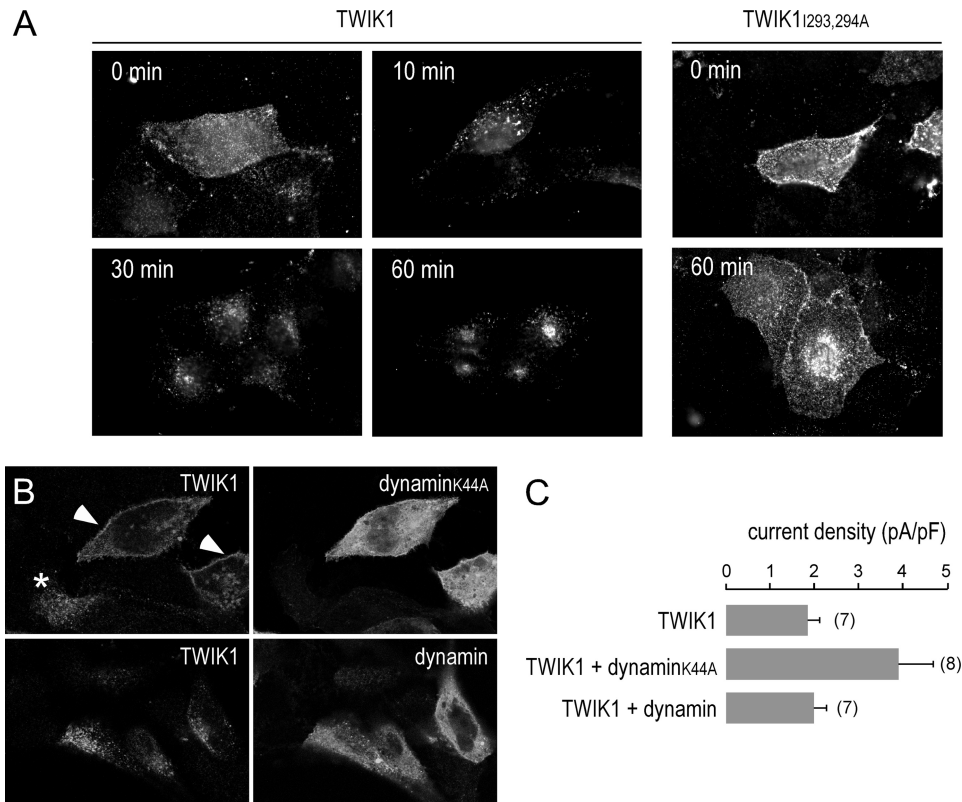
**Activation of  $G_i$ -coupled Receptors Increases TWIK1 Currents—**The data presented above indicate that TWIK1 silencing is related to its intracellular sequestration in recycling endosomes. In a recent article, Deng *et al.* (28) reported the inhibitory action of serotonin in neurons of the entorhinal cortex and linked this inhibition to the activation of a TWIK1 current. They also showed that in HEK cells, TWIK1 was stimulated by activation of the serotonin receptor 5-HT<sub>1R</sub>. We observed a similar effect. Upon application of serotonin, a current appears in TWIK1-expressing HEK cells ( $17.9 \pm 4.3$  pA/pF at +40 mV after 10 min of 5-HT application (50  $\mu$ M) versus  $7.9 \pm 1.3$  pA/pF before application,  $n = 15$ ) that is not present in control cells ( $3.5 \pm 0.6$  pA/pF after 5-HT application versus  $2.8 \pm 0.5$  pA/pF before application,  $n = 15$ , Fig. 6, *A* and *B*). This current displays a rapidly inactivating component (data not shown), as observed in MDCK cells and *Xenopus* oocytes (Fig. 3). As expected, TWIK1I293A,I294A produces much more current than TWIK1, but there is no significant effect of serotonin application ( $44 \pm 3.6$  pA/pF at +40 mV after 10 min of 5-HT application versus  $42.1 \pm 4.6$  pA/pF before application,  $n = 5$ ).

Binding of 5-HT to 5-HT<sub>1R</sub> activates  $G_i$  protein that inhibits adenylate cyclase, resulting in a decrease in cAMP levels and cAMP-dependent protein kinase activity. TWIK-related K<sup>+</sup> channels (TREK1) are inhibited by cAMP-dependent protein kinase-dependent phosphorylation of a serine residue located in their cytoplasmic C terminus (21, 29). Activation of  $G_i$ -coupled receptors results in an increase of TREK1 currents related to a dephosphorylation of the same residue (30). As expected, activation of 5-HT<sub>1R</sub> results in an increase of TREK1 currents in HEK cell ( $92.8 \pm 8$  pA/pF at +40 mV after 10 min of 5-HT application versus  $50.3 \pm 9.8$  pA/pF before application,  $n = 8$ ,

line scan through cells expressing TWIK1 or TWIK1I293A,I294A. Scan sections are shown as a white line on the images. Stars indicate signals at the peripheral plasma membrane. *B–D*, immunolocalization in polarized MDCK cells by confocal microscopy. *B*, schematic representation of the polarized cells monolayer, with the  $x_1$  and  $x_2$  axes corresponding to cross-sections shown in *C* and *D*. ZO-1 is expressed in tight junctions represented here as dark ovals. *C* and *D*, cross-sections in monolayer of polarized cells expressing TWIK1 (*C*) or TWIK1I293A,I294A (*D*). *Z* is the reconstituted xz image corresponding to a z section along the white line. Asterisks mark cells in which the actin-rich microvilli constituting the brush-border staining are labeled as dot. The position of the  $x_1$  axis in these cells is indicated in *B*. Filled arrowheads show the colabeling of actin and TWIK1I293A,I294A in these microvilli (not seen with TWIK1 in cells labeled with an asterisk).



## TWIK1 Trafficking Rules Its Functional Expression



**FIGURE 5. Dynamic TWIK1 retrieval from the cell surface.** A, transfected MDCK cells were incubated at 4 °C in the presence of an antibody directed against the M1P1 external loop of TWIK1. After washes, cells were incubated at 37 °C for the indicated period of time, then fixed, permeabilized, and TWIK1-antibody complexes were labeled with a fluorescent secondary antibody. The same experiment was performed on MDCK cells expressing TWIK1 (left panels) and TWIK1I293A,I294A (right panels). B, MDCK cells were co-transfected with TWIK1 and dynamin-GFP or dynaminK44-GFP. Twenty-four h after transfection, cells were fixed and permeabilized. Total TWIK1 was detected by immunocytochemistry. A redistribution of TWIK1 at the cell surface is clearly visible in cells co-expressing TWIK1 and dynaminK44 (filled arrowheads) but not in cells expressing TWIK1 alone (asterisk) or cells co-expressing TWIK1 and dynamin. C, current densities measured at +40 mV in conditions corresponding to B. Each value is the mean  $\pm$  S.E. (error bars), and the number of tested cell is indicated.

Fig. 6, C and D). This effect is rapid. After less than 1 min (Fig. 6C), the effect is maximal. For TWIK1, the effect is much slower (Fig. 6A), and  $>7$  min is necessary to reach a plateau (data not shown), suggesting that unlike TREK1, TWIK1 is not regulated by dephosphorylation of channels already present in the plasma membrane. The slow kinetics of activation of TWIK1 and the absence of effect on TWIK1I293,294A strongly suggest that 5-HT<sub>1</sub>R activation acts on the trafficking of TWIK1 and results in more channels at the plasma membrane. We have observed the same effect in MDCK cells by activating endogenous G<sub>i</sub>-coupled adrenergic receptor  $\alpha$ 2A-AR (31): application of  $\alpha$ 2-AR agonist clonidine promotes current expression in TWIK1-expressing cells:  $20.75 \pm 1.4$  pA/pF at +40 mV after 10 min of clonidine application (10  $\mu$ M) versus  $4.3 \pm 0.4$  pA/pF before application that is not present in control cells ( $3.7 \pm 2$  pA/pF after 10 min versus  $1.9 \pm 0.4$  pA/pF before application).

### DISCUSSION

Low or absent functional expression of TWIK1 in heterologous expression systems has led to contradictory reports. Here, we provide key insights on this unusual behavior. TWIK1 is a functional channel but is constitutively and rapidly internalized from the cell surface before being stored in recycling endo-

somes. At any time, a modest pool of neosynthesized channels is present at the cell surface *en route* to the recycling endosomes. Given the high level of expression in *Xenopus* oocytes, the fraction of channels present in the plasma membrane could be sufficient to generate a small but detectable current. In mammalian cells, the expression level may be lower, or constitutive endocytosis more effective, resulting in no measurable currents. Here, we also show that stimulation of G<sub>i</sub>-coupled receptors 5-HT<sub>1</sub>R and  $\alpha$ 2A-AR leads to an increase of TWIK1 current. This effect does not seem to be related to a regulation of channels already present at the cell surface because TWIK1I293A,I294A is not stimulated.

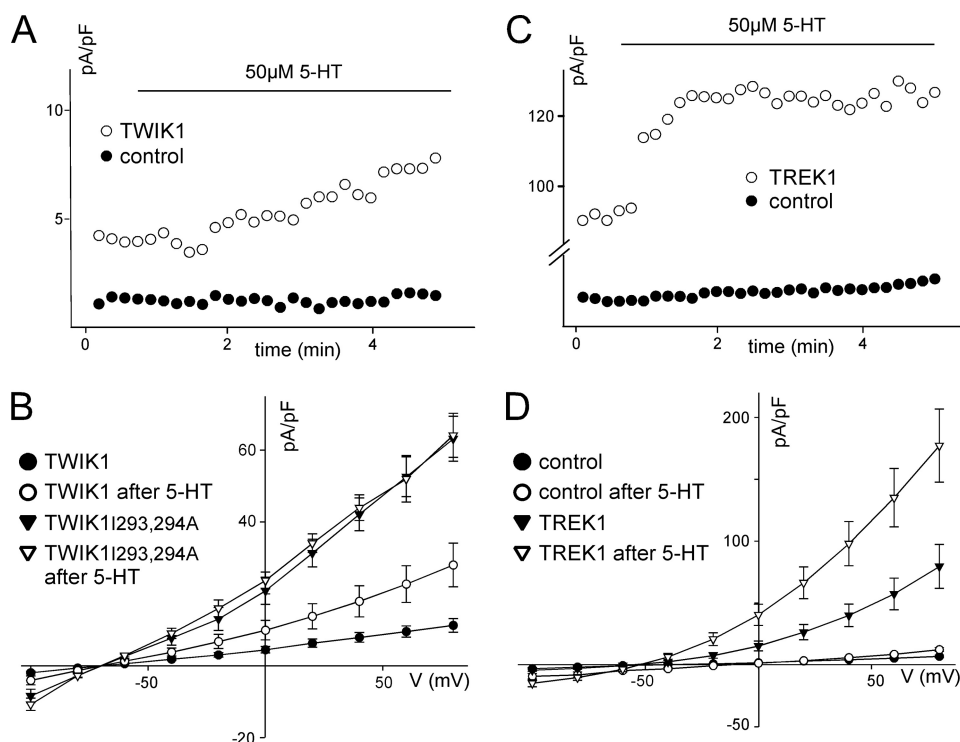
We have previously established that TWIK1 is expressed in the pericentriolar endosomal recycling compartment of nonpolarized cells and in the corresponding subapical recycling compartment of polarized epithelial cells. We have also shown that TWIK1 interacts with a complex of proteins comprising the nucleotide exchange factor EFA6 and the small G protein ARF6 (20), a protein actively involved in the recycling of membrane proteins and

plasma membrane (32). These results suggested that the absence of TWIK1 at the plasma membrane was a major factor in the lack of TWIK1 current upon heterologous expression. As an additional support for this hypothesis, we have shown that a fusion protein comprising HcRed fluorescent protein fused to the N terminus of TWIK1 is able to reach the plasma membrane producing macroscopic currents in MDCK and COS-7 cells. We have proposed that the steric hindrance and/or the masking of retrieval signals resulting from the fused peptide was able to relieve intracellular retention of TWIK1 or to slow its retrieval from the plasma membrane. Now, we have identified a retrieval motif consisting of a diisoleucine repeat located in the cytoplasmic C terminus of TWIK1. When this motif is mutated, the resulting TWIK1I293A,I294A channel redistributes at the cell surface and produces macroscopic currents (Figs. 2 and 4). In the mouse TWIK1 protein, isoleucine 24 is replaced by a methionine. However, methionine 294 plays the same role as isoleucine, both residues being interchangeable without affecting surface retrieval (Fig. 2A). Dileucine-based motifs are classical signals for endocytosis (25). They can accommodate an isoleucine instead of the second leucine. Their consensus sequence is D/E(XXXL)L/I. They form a link between membrane proteins and the vesicular budding





## TWIK1 Trafficking Rules Its Functional Expression



**FIGURE 6. Activation of the serotonin receptor 5-HT<sub>1</sub>R stimulates TWIK1 and TREK1 channels in HEK cells.** Cells were transfected with a plasmid for simultaneous expression of 5-HT<sub>1</sub>R and GFP (pC15HT1R-Ires-GFP) and with a plasmid for the simultaneous expression of *DiscoSoma* red fluorescent protein and the indicated K<sup>+</sup> channel thanks to an Internal Ribosome Entry Site (IRES) (pTWIK1-Ires-DsRed, pTWIK1I293A,I294A-Ires-DsRed, and pTREK1-Ires-DsRed). Cells co-expressing 5-HT<sub>1</sub>R and the indicated channel were visualized by green and red fluorescences. Control cells express only 5-HT<sub>1</sub>R (showing green fluorescence but not red fluorescence). Forty-eight h after transfection, HEK cells co-expressing 5-HT<sub>1</sub>R and TWIK1 or TWIK1I293A,I294A (A and B), or TREK1 (C and D) were perfused with 5-HT as indicated, and currents were measured at +40 mV (A and C). The corresponding current-voltage relationships deduced from steady-state currents recorded before and after a 10-min application of 5-HT are shown in B and D.

machinery through interaction with adaptor proteins and recruitment of the clathrin coat protein (33, 34). Sometimes both leucine residues are replaced by isoleucines. For example, K<sup>+</sup> channel Kir2.3 contains a diisoleucine motif that is required for internalization (35). However, the two isoleucines cannot be replaced by leucines without losing Kir2.3 endocytosis. In TWIK1, both isoleucines can be replaced by leucines without affecting endocytosis (data not shown), indicating that diisoleucine-based motifs in TWIK1 and Kir2.3 are both unconventional but different.

In polarized MDCK cells, replacement of isoleucines by alanines abolishes the subapical distribution of TWIK1: the channel redistributes in apical and basolateral membranes (Fig. 4D). These data indicate that after synthesis, TWIK1 reaches the plasma membrane in a nonpolarized manner, before being internalized and specifically addressed to the subapical recycling compartment. What could be the signal responsible for this localization? Our study shows that this signal is located between residues 269 and 299 and can be transferred to TASK3 by replacing its C terminus by the TWIK1 C terminus (supplemental Fig. 1). So far, the detailed study of this sorting signal has been impeded by the fact that many mutations in this region lead to retention of the mutants in the endoplasmic reticulum (data not shown). Also, given that mutation of the diisoleucine motif blocks TWIK1 in the plasma membrane, we could not establish whether this unconventional dileucine motif necessary for

endocytosis has also a role in the subsequent sorting of TWIK1 and its final localization in the recycling endosomal compartment.

Many channels and receptors transit through recycling endosomes where they accumulate to various extents. For instance, pacemaker channel HCN4 (36) and aquaporin AQ2 (37) are detected mainly in this compartment. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator CFTR also recycles at the cell surface from recycling endosomes (38, 39). Such a recycling has also been reported for AMPA receptors (40), KCNQ1/KCNQ2 (41) and TRPV5, V6 channels (42). All of these membrane proteins that internalize but are not addressed to late endosomes and lysosomes for degradation recycle to the plasma membrane in a controlled manner (43, 44). For example, HCN4 density at the cell surface is increased following stimulation by insulin in a mechanism involving phospholipase D (36). KCNQ1/KCNE1 exocytosis is enhanced by the serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 and requires ion and activation of phosphoinositide

3-phosphate 5-kinase and generation of phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate (41). AQ2 increases at the cell surface following vasopressin binding to its G<sub>s</sub>-coupled receptor cAMP-dependent protein kinase activation (45). Here, we show that stimulation of a G<sub>i</sub>-coupled serotonin receptor could provide a physiological signal for a TWIK1 increase at the cell surface. The effect is much slower than that for TREK1, which is regulated by dephosphorylation, and is not observed for TWIK1I293A,I294A, which is already present at the cell surface. Currently, we do not know whether the increase of TWIK1 is due to a forward signal that allows its exit from a particular recycling subcompartment or to inhibition of its endocytosis leading to accumulation at the cell surface. The slow kinetics suggest that the latter hypothesis is the more likely. A similar behavior has already been described: Vasopressin causes AQ2 to accumulate in "endocytosis-resistant" membrane domains (46). TWIK1 and G<sub>i</sub>-coupled receptors to hormones and neuromodulators are both expressed in many tissues. Recruitment of TWIK1 K<sup>+</sup> channels to the cell surface may constitute a general mechanism of cell excitability modulation by hormones binding to G<sub>i</sub>-coupled receptors. Changes in membrane potential resulting from this regulation may also play a role in modifying transport in the renal proximal tubule where TWIK1 is well expressed. In rat proximal tubule membrane brush border, ionic permeability is under regulation of hormones that activate or deactivate G proteins that govern



adenylate cyclase activity ( $G_i/G_o$ ). For example, activation of  $G_i$  by angiotensin II significantly decreases  $Cl^-$  permeability relative to that of  $K^+$  (47). In future studies, it would be interesting to evaluate the contribution of cell surface TWIK1 readdressing in these variations of membrane ionic permeability. It is also interesting to note that by binding to the cytoplasmic C terminus of TWIK1, the complex made of EFA6-ARF6<sub>GDP</sub> may mask the diisoleucine-based motif and modulate TWIK1 endocytosis. Whether the two pathways involving EFA6 and  $G_i$  and leading to an increase of TWIK1 at the cell surface act independently or in a coordinated manner remains to be established.

*Acknowledgment*—We thank Maud Larroque for technical assistance.

## REFERENCES

- Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Duprat, F., Lazdunski, M., Romey, G., and Barhanin, J. (1996) *EMBO J.* **15**, 1004–1011
- Lesage, F., Reyes, R., Fink, M., Duprat, F., Guillemare, E., and Lazdunski, M. (1996) *EMBO J.* **15**, 6400–6407
- Goldstein, S. A., Bayliss, D. A., Kim, D., Lesage, F., Plant, L. D., and Rajan, S. (2005) *Pharmacol. Rev.* **57**, 527–540
- Kim, D. (2005) *Curr. Pharm. Des.* **11**, 2717–2736
- Lesage, F., and Lazdunski, M. (2000) *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **279**, F793–F801
- Patel, A. J., and Honoré, E. (2001) *Trends Neurosci.* **24**, 339–346
- Talley, E. M., Sirois, J. E., Lei, Q., and Bayliss, D. A. (2003) *Neuroscientist* **9**, 46–56
- Barriere, H., Belfodil, R., Rubera, I., Tauc, M., Lesage, F., Poujeol, C., Guy, N., Barhanin, J., and Poujeol, P. (2003) *J. Gen. Physiol.* **122**, 177–190
- Warth, R., Barrière, H., Meneton, P., Bloch, M., Thomas, J., Tauc, M., Heitzmann, D., Romeo, E., Verrey, F., Mengual, R., Guy, N., Bendahhou, S., Lesage, F., Poujeol, P., and Barhanin, J. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 8215–8220
- Aller, M. I., Veale, E. L., Linden, A. M., Sandu, C., Schwaninger, M., Evans, L. J., Korpi, E. R., Mathie, A., Wisden, W., and Brickley, S. G. (2005) *J. Neurosci.* **25**, 11455–11467
- Heitzmann, D., Derand, R., Jungbauer, S., Bandulik, S., Sterner, C., Schweda, F., El Wakil, A., Lalli, E., Guy, N., Mengual, R., Reichold, M., Tegtmeyer, I., Bendahhou, S., Gomez-Sanchez, C. E., Aller, M. I., Wisden, W., Weber, A., Lesage, F., Warth, R., and Barhanin, J. (2008) *EMBO J.* **27**, 179–187
- Heurteaux, C., Guy, N., Laigle, C., Blondeau, N., Duprat, F., Mazzuca, M., Lang-Lazdunski, L., Widmann, C., Zanzouri, M., Romey, G., and Lazdunski, M. (2004) *EMBO J.* **23**, 2684–2695
- Alloui, A., Zimmermann, K., Mamet, J., Duprat, F., Noël, J., Chemin, J., Guy, N., Blondeau, N., Voilley, N., Rubat-Coudert, C., Borsotto, M., Romey, G., Heurteaux, C., Reeh, P., Eschalier, A., and Lazdunski, M. (2006) *EMBO J.* **25**, 2368–2376
- Heurteaux, C., Lucas, G., Guy, N., El Yacoubi, M., Thümmel, S., Peng, X. D., Noble, F., Blondeau, N., Widmann, C., Borsotto, M., Gobbi, G., Vaugeois, J. M., Debonnel, G., and Lazdunski, M. (2006) *Nat. Neurosci.* **9**, 1134–1141
- Patel, A. J., Maingret, F., Magnone, V., Fosset, M., Lazdunski, M., and Honoré, E. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 28722–28730
- Duprat, F., Lesage, F., Fink, M., Reyes, R., Heurteaux, C., and Lazdunski, M. (1997) *EMBO J.* **16**, 5464–5471
- Rajan, S., Plant, L. D., Rabin, M. L., Butler, M. H., and Goldstein, S. A. (2005) *Cell* **121**, 37–47
- Wilson, V. G., and Rosas-Acosta, G. (2005) *Sci. STKE* **2005**, pe32
- Feliciangeli, S., Bendahhou, S., Sandoz, G., Gounon, P., Reichold, M., Warth, R., Lazdunski, M., Barhanin, J., and Lesage, F. (2007) *Cell* **130**, 563–569
- Decressac, S., Franco, M., Bendahhou, S., Warth, R., Knauer, S., Barhanin, J., Lazdunski, M., and Lesage, F. (2004) *EMBO Rep.* **5**, 1171–1175
- Fink, M., Duprat, F., Lesage, F., Reyes, R., Romey, G., Heurteaux, C., and Lazdunski, M. (1996) *EMBO J.* **15**, 6854–6862
- Gounon, P. (2002) in *Methods in Microbiology, Molecular Cellular Microbiology* (Sansonetti, P., and Zychlinsky, A., eds) vol. **31**, 551–557, Academic Press, San Diego
- Newman, G. R., and Hobot, J. A. (2001) in *Resin Microscopy and One-Section Immunocytochemistry*, 2nd Ed., Springer-Verlag, Berlin
- Griffiths, G. (1993) in *Fine Structure Immunocytochemistry*, Springer-Verlag, Berlin
- Bonifacino, J. S., and Traub, L. M. (2003) *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 395–447
- Damke, H., Baba, T., Warnock, D. E., and Schmid, S. L. (1994) *J. Cell Biol.* **127**, 915–934
- Herskovits, J. S., Burgess, C. C., Obar, R. A., and Vallee, R. B. (1993) *J. Cell Biol.* **122**, 565–578
- Deng, P. Y., Poudel, S. K., Rojanathammanee, L., Porter, J. E., and Lei, S. (2007) *Mol. Pharmacol.* **72**, 208–218
- Patel, A. J., Honoré, E., Maingret, F., Lesage, F., Fink, M., Duprat, F., and Lazdunski, M. (1998) *EMBO J.* **17**, 4283–4290
- Cain, S. M., Meadows, H. J., Dunlop, J., and Bushell, T. J. (2008) *Mol. Cell. Neurosci.* **37**, 32–39
- Okusa, M. D., Lynch, K. R., Rosin, D. L., Huang, L., and Wei, Y. Y. (1994) *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **267**, F347–F353
- Altschuler, Y., Liu, S., Katz, L., Tang, K., Hardy, S., Brodsky, F., Apodaca, G., and Mostov, K. (1999) *J. Cell Biol.* **147**, 7–12
- Bonifacino, J. S., and Lippincott-Schwartz, J. (2003) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **4**, 409–414
- Edeling, M. A., Smith, C., and Owen, D. (2006) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **7**, 32–44
- Mason, A. K., Jacobs, B. E., and Welling, P. A. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 5973–5984
- Hardel, N., Harmel, N., Zolles, G., Fakler, B., and Klocker, N. (2008) *Cardiovasc. Res.* **79**, 52–60
- Sun, T. X., Van Hoek, A., Huang, Y., Bouley, R., McLaughlin, M., and Brown, D. (2002) *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **282**, F998–F1011
- Gentzsch, M., Chang, X. B., Cui, L., Wu, Y., Ozols, V. V., Choudhury, A., Pagano, R. E., and Riordan, J. R. (2004) *Mol. Biol. Cell* **15**, 2684–2696
- Picciano, J. A., Ameen, N., Grant, B. D., and Bradbury, N. A. (2003) *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **285**, C1009–C1018
- Park, M., Penick, E. C., Edwards, J. G., Kauer, J. A., and Ehlers, M. D. (2004) *Science* **305**, 1972–1975
- Seeböhm, G., Strutz-Seeböhm, N., Birkin, R., Dell, G., Buccini, C., Spinoso, M. R., Baltaev, R., Mack, A. F., Korniyuchuk, G., Choudhury, A., Marks, D., Pagano, R. E., Attali, B., Pfeuffer, A., Kass, R. S., Sanguinetti, M. C., Taware, J. M., and Lang, F. (2007) *Circ. Res.* **100**, 686–692
- van de Graaf, S. F., Hoenderop, J. G., van der Kemp, A. W., Gisler, S. M., and Bindels, R. J. (2006) *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **452**, 407–417
- Hoekstra, D., Tyteca, D., and van IJzendoorn, S. C. (2004) *J. Cell Sci.* **117**, 2183–2192
- Mellman, I., and Nelson, W. J. (2008) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **9**, 833–845
- Nedvetsky, P. I., Tamma, G., Beulshausen, S., Valenti, G., Rosenthal, W., and Klusmann, E. (2009) *Handb. Exp. Pharmacol.* **190**, 133–157
- Bouley, R., Hawthorn, G., Russo, L. M., Lin, H. Y., Ausiello, D. A., and Brown, D. (2006) *Biol. Cell* **98**, 215–232
- Lipkowitz, M. S., London, R. D., Beck, J. C., and Abramson, R. G. (1992) *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **263**, F144–F151





L'absence ou les très faibles courants générés par les sous-unités TWIK1 dans les systèmes d'expression hétérologue ont suscité la curiosité de plusieurs laboratoires s'intéressant à la famille des canaux potassiques à deux domaines P et au trafic intracellulaire, dont le nôtre.

Nous avons montré que le canal TWIK1 est bel et bien fonctionnel mais il est quasiment impossible d'en enregistrer les courants car il est très rapidement et constitutivement internalisé lorsqu'il est exprimé à la membrane plasmique. Il est alors adressé dans les endosomes de recyclage.

Ce résultat concorde parfaitement avec ce que nous connaissions. Les seuls courants TWIK1 enregistrés l'ont été dans des ovocytes de xénope. On sait qu'en permanence un certain nombre de sous-unités TWIK1 néosynthétisées sont présentes à la membrane plasmique avant leur internalisation. Dans les ovocytes de xénope, qui sont de grosses cellules, il est possible que le nombre de sous-unités présentes à la membrane à un temps donné soit suffisant pour permettre leur enregistrement, ce qui ne serait pas le cas dans les cellules de mammifères beaucoup plus petites. La seconde possibilité est que les mécanismes d'endocytose sont moins efficaces dans l'ovocyte de xénope que dans les cellules de mammifères.

D'autres éléments renforcent notre théorie selon laquelle l'absence de courants TWIK1 est due à son endocytose constitutive.

Nous avons montré que la stimulation de récepteurs couplés à la protéine  $G_i$  augmente les courants TWIK1. Cet effet n'est pas lié à une régulation directe des canaux présents à la surface, de type phosphorylation, car il n'est pas observé lorsque les cellules expriment le mutant TWIK1I293A,I294A. L'augmentation des courants TWIK1 en réponse à l'activation des récepteurs couplés  $G_i$  est très lente, contrairement à ce que j'ai pu observer pour le canal TREK1, qui est lui régulé par déphosphorylation. Cela concorde parfaitement avec notre hypothèse selon laquelle l'augmentation des courants TWIK1 provient de la fusion de vésicules avec la membrane plasmique, un phénomène beaucoup plus lent qu'une déphosphorylation. De plus il a été démontré il y a quelques années que TWIK1 interagit avec un complexe de protéines qui comprend le facteur d'échange nucléotidique EFA6 et la petite protéine G, ARF6, qui est impliquée dans le recyclage de protéines et de membrane plasmique (Decressac *et al.*, 2004). Enfin, toutes les expériences d'immunocytochimie ont montré que TWIK1 est présent dans les endosomes de recyclage des cellules polarisées ou dans un compartiment périnucléaire équivalent des cellules non polarisées.



Tous ces résultats suggèrent que l'absence du canal TWIK1 de la membrane plasmique est la principale explication à son silence dans les systèmes d'expression hétérologue.

Nous avons identifié le motif responsable de l'internalisation constitutive du canal TWIK1. Il s'agit d'un motif comprenant deux résidus isoleucines à l'extrémité C-terminale du canal. De façon surprenante, dans la séquence murine de la sous-unité TWIK1, le résidu isoleucine en position 294 est remplacé par une méthionine. Néanmoins la mutation du motif en I293A,M294A provoque les mêmes effets que la mutation I293A,I294A, à savoir la relocalisation du canal à la membrane plasmique, qui peut alors produire des courants macroscopiques.

Les motifs dileucine sont connus depuis longtemps pour être des signaux d'endocytose (Bonifacino and Traub, 2003). Le second résidu leucine peut être remplacé par un résidu isoleucine sans conséquences. Cette séquence consensus forme un lien entre les protéines membranaires et la machinerie vésiculaire grâce à l'interaction avec des protéines adaptatrices et le recrutement du manteau de clathrine.

Plus rarement, ce sont les deux résidus leucine de ce site consensus qui peuvent être remplacés par deux isoleucines comme cela est le cas du canal TWIK1, mais aussi du canal Kir<sub>2.3</sub>. Ces séquences consensus non conventionnelles conservent tout de même leur capacité à induire l'endocytose.

D'autres canaux et récepteurs transitent également par les endosomes de recyclage au cours de leur "vie". Le canal chlore CFTR ou encore le récepteur AMPA sont recyclés de cette façon, ils sont internalisés depuis la membrane plasmique dans les endosomes de recyclage. L'internalisation ou la sortie des endosomes de ces protéines sont contrôlées par des signaux physiologiques (Hoekstra *et al.*, 2004) (Mellman and Nelson, 2008), comme la liaison du ligand sur son récepteur, la phosphorylation ou la déphosphorylation du récepteur....

L'insertion de canaux TWIK1 dans la membrane plasmique est déclenchée par l'activation d'un récepteur couplé à la protéine G<sub>i</sub> et à une diminution de la concentration intracellulaire d'AMPc. Cependant nous ne savons pas si l'augmentation du nombre de canaux TWIK1 dans la membrane plasmique est la conséquence d'une sortie accélérée des endosomes de recyclage ou une inhibition de l'endocytose menant à l'accumulation du canal dans la membrane plasmique. La cinétique très lente que j'ai pu observer lors des



expériences d'électrophysiologie suggère que la seconde hypothèse est la bonne. Ce serait donc l'endocytose des canaux TWIK1 qui est ralentie ou inhibée. Dans ce cas, l'augmentation du nombre de canaux dans la membrane plasmique dépend de la néosynthèse de sous-unités TWIK1.

Les canaux TWIK1 ainsi que les récepteurs aux hormones ou aux neurotransmetteurs couplés aux protéines  $G_i$  sont présents dans de nombreux tissus. Le recrutement de canaux TWIK1 au niveau de la membrane plasmique pourrait constituer un mécanisme de régulation de l'excitabilité membranaire en réponse à la liaison d'hormones ou de neurotransmetteurs sur leurs récepteurs couplés à la protéine  $G_i$ . La modification du potentiel de membrane provoquée par l'insertion de canaux potassiques dans la membrane plasmique pourrait également être impliquée dans le transport rénal au niveau du tubule proximal dans lequel TWIK1 est exprimé.

La liaison du complexe EFA6/ARF6 sur l'extrémité C-terminale de TWIK1 pourrait éventuellement masquer le motif diisoleucine et moduler l'endocytose. L'action indépendante ou coordonnée de ces deux modes de régulation, qui mènent tous deux à une augmentation du nombre de canaux TWIK1 à la surface reste à déterminer.



### III.3 LA DEPOLARISATION INDUITE PAR LE GLUCOSE DANS LES NEURONES DE L'HYPOTHALAMUS NE DEPEND PAS DES CANAUX POTASSIQUES A DEUX DOMAINES P

Cette étude fut initiée par les Dr Jacques Barhanin, Florian Lesage et Alice Guyon. J'ai contribué à cette étude en réalisant la caractérisation des souris invalidées pour le gène codant le canal TASK3. Tous les enregistrements électrophysiologiques ont été effectués par le Dr Alice Guyon.

La modulation de l'activité neuronale par le glucose est cruciale pour coordonner la balance énergétique et le comportement alimentaire notamment de l'individu. La structure cérébrale impliquée dans les comportements alimentaires est l'hypothalamus. Les modifications de la concentration extracellulaire de glucose peuvent entraîner soit une excitation, soit une inhibition des neurones de l'hypothalamus en fonction de la sous-population de neurones considérée. La population de neurones excitée par une augmentation de glucose se comporte comme les cellules  $\beta$  du pancréas, c'est-à-dire que l'augmentation de glucose conduit à une augmentation de la concentration intracellulaire d'ATP, à la fermeture des canaux potassiques sensibles à l'ATP ( $K_{ATP}$ ) et donc à dépolarisation du neurone (Ibrahim *et al.*, 2003). La seconde population de neurones, constituée par les neurones qui produisent de l'orexine est inhibée par une augmentation du glucose extracellulaire (Burdakov *et al.*, 2005) (Yamanaka *et al.*, 2003). Ces neurones projettent dans de nombreuses aires cérébrales et sont impliqués dans la régulation de l'appétit et du métabolisme. Dans les neurones à orexine de l'hypothalamus, une élévation de la concentration extracellulaire en glucose de 0.2 à 4.5 mM produit une lente hyperpolarisation.

En 2006 l'équipe du Dr D. Burdakov a publié une étude détaillée du mécanisme permettant aux neurones à orexine de ressentir la concentration en glucose (Burdakov *et al.*, 2006). Il fut montré il y a quelques années qu'une conductance potassique apparaît dans les neurones à orexine en réponse à une augmentation de la concentration extracellulaire en glucose. L'identification tant électrophysiologique que moléculaire de ce canal manquait. Burdakov *et al.* ont tenté de caractériser cette conductance potassique. Ils ont ainsi montré que le courant potassique s'active très rapidement et a les mêmes caractéristiques électrophysiologiques que les courants de fond de type GHK en condition physiologiques. Ils ont également mesuré la conductance unitaire de ce canal et ont montré que ces courants sont sensibles au rouge de ruthénium et au pH extracellulaire. A partir de tous ces éléments ils ont avancé l'hypothèse que le canal TASK3 est le constituant principal du courant potassique activé par le glucose.





Après un examen minutieux des différents résultats obtenus par le Dr Burdakov en 2006, nous avons pensé que les propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques enregistrées correspondent mieux à l'hétérotétramère TASK1/TASK3 plutôt qu'à l'homotétramère TASK3.

Nous avons à notre disposition les souris invalidées pour le gène TASK3. Nous avons donc décidé de vérifier l'hypothèse avancée par le laboratoire du Dr Burdakov. J'ai réalisé des expériences d'immunohistochimie sur des coupes flottantes de cerveaux de souris afin de vérifier la disparition des protéines TASK3 dans les cerveaux de souris TASK3<sup>-/-</sup>. J'ai effectué un marquage avec un anticorps anti-TASK3 développé au laboratoire sur des coupes de cervelet et d'hypothalamus. Le marquage très intensif dans la couche moléculaire du cervelet de cerveaux de souris sauvage est totalement absent sur les coupes de cervelet de souris TASK3<sup>-/-</sup>. Dans les neurones hypothalamiques de souris sauvages un marquage très faible a été observé, mais il ne présentait pas de différences significatives avec le marquage obtenu sur les neurones hypothalamiques issus de souris TASK3<sup>-/-</sup>. Cela indiqua que les quantités de canaux TASK3 sont trop faibles pour être détectées par cette méthode dans l'hypothalamus. Cependant nous avons tout de même démontré que la protéine TASK3 n'est plus présente dans les cellules neuronales de souris TASK3<sup>-/-</sup>.

Le Dr Alice Guyon a enregistré la réponse au glucose des neurones à orexine de souris TASK3<sup>-/-</sup>, TASK1<sup>-/-</sup> et TASK1/TASK3<sup>-/-</sup>, toutes disponibles au laboratoire. Pour ces trois lignées de souris, la réponse au glucose des neurones à orexine n'était pas modifiée par rapport à la réponse de souris sauvages.

L'hyperpolarisation des neurones à orexine est inhibée par l'application extracellulaire d'un pH acide (pH = 6.0). Cet effet a été retrouvé chez les souris TASK1/TASK3<sup>-/-</sup>. De plus l'application extracellulaire d'une solution acide sur ces neurones provoque une dépolarisation lente qui ne correspond pas aux cinétiques de fermeture des canaux TASK par l'acidification (Kang and Kim, 2004). Il semble qu'un autre phénomène, probablement indirect permette de coupler l'acidification extracellulaire à l'excitabilité membranaire.

L'une des caractéristiques de la conductance potassiques activée par le glucose est sa sensibilité à l'halothane. Parmi la famille des canaux potassiques à deux domaines P, seuls les canaux TASK (TASK1 et TASK3) et TREK (TREK1, TREK2 et TRAAK) sont sensibles à l'halothane (Patel *et al.*, 1999). Les mêmes expériences ont donc été réalisées sur les neurones de souris triple KO TREK1/TREK2/TRAAK<sup>-/-</sup> mais de nouveau l'hyperpolarisation induite par le glucose n'était pas modifiée.



Le Dr Alice Guyon a également montré que de faibles concentrations en baryum (10-200  $\mu$ M) inhibent la conductance potassique responsable de l'hyperpolarisation. En présence de baryum, l'acidification n'a plus aucun effet suggérant que la sensibilité au baryum et à l'acidification sont portées par un même canal. Les seuls  $K_{2P}$  sensibles à de telles concentrations de baryum sont les canaux TWIK1 et TWIK2. Cependant TWIK2 n'est pas présent dans le cerveau (Patel *et al.*, 2000) et TWIK1 ne possède pas les caractéristiques électrophysiologiques de la conductance potassique des neurones à orexine (Lesage *et al.*, 1996).

La cinétique d'inhibition par le baryum est lente et pourrait correspondre à un blocage voltage-dépendant comme cela a été montré pour les canaux Kir (Klein *et al.*, 1999).

Nous avons donc montré dans cette étude que les canaux potassiques de la famille des  $K_{2P}$  ne sont pas impliqués dans l'hyperpolarisation enregistrée dans les neurones à orexine après une augmentation extracellulaire de glucose. Cependant la nature de cette conductance n'a toujours pas été identifiée.



## Article 3

**Glucose inhibition persists in hypothalamic neurons lacking tandem-pore K<sup>+</sup> channels.**

Guyon A., **Tardy M.**, Rovère C., Nahon J-L., Barhanin J. and Lesage F.

**The journal of Neuroscience**, February 25, 2009, 29(8) : 2528-2533.



# Glucose Inhibition Persists in Hypothalamic Neurons Lacking Tandem-Pore $K^+$ Channels

Alice Guyon, Magalie P. Tardy, Carole Rovère, Jean-Louis Nahon,\* Jacques Barhanin,\* and Florian Lesage\*

Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 6097, Université de Nice Sophia-Antipolis, 06560 Valbonne, France

Glucose sensing by hypothalamic neurons triggers adaptive metabolic and behavioral responses. In orexin neurons, extracellular glucose activates a leak  $K^+$  current promoting electrical activity inhibition. Sensitivity to external acidification and halothane, and resistance to ruthenium red designated the tandem-pore  $K^+$  ( $K_{2p}$ ) channel subunit TASK3 as part of the glucose-induced channel. Here, we show that glucose inhibition and its pH sensitivity persist in mice lacking TASK3 or TASK1, or both subunits. We also tested the implication of another class of  $K_{2p}$  channels activated by halothane. In the corresponding TREK1/2/TRAAC triple knock-out mice, glucose inhibition persisted in hypothalamic neurons ruling out a major contribution of these subunits to the glucose-activated  $K^+$  conductance. Finally, block of this glucose-induced hyperpolarizing current by low  $Ba^{2+}$  concentrations was consistent with the conclusion that  $K_{2p}$  channels are not required for glucosensing in hypothalamic neurons.

**Key words:** orexin neuron; leak potassium channel; resting potential; gene inactivation; neuropeptide; secretion

## Introduction

Modulation of neuronal activity by glucose is pivotal in coordinating energy balance and behavior. Changing levels of extracellular glucose can lead to either excitation or inhibition of glucose-sensitive hypothalamic neurons. Neurons excited by rising glucose behave similarly to the  $\beta$  cells of the endocrine pancreas (Ibrahim et al., 2003). In these cells, an increase in glucose metabolism gives rise to elevated ATP levels that promote closure of ATP-sensitive  $K^+$  channels ( $K_{ATP}$ ) and depolarization. Other hypothalamic neurons, such as neurons producing orexins/hypocretins, are inhibited by rising glucose (Yamanaka et al., 2003; Burdakov et al., 2005). They project to all major brain areas, with prominent innervation of arousal and autonomic regions where orexins are released and act on specific G-protein-coupled receptors. Defect in orexin signaling results in narcolepsy (Chemelli et al., 1999), although orexin neurons also regulate appetite and metabolism (Hara et al., 2001).

Recently, Burdakov et al. (2006) provided a careful description of the glucosensing mechanism in orexin neurons. They showed that the glucose-activated  $K^+$  conductance displays

rapid activation and minimal time-dependent decay, as well as a current–potential relationship exhibiting Goldman–Hodgkin–Katz (GHK) outward rectification in physiological  $K^+$  conditions. Burdakov et al. (2006) next tested the sensitivity of the glucosensing mechanism to external pH and ruthenium red, and measured the unitary conductance of the glucose-induced channel. Based on these characteristics, they concluded that the  $K_{2p}$  Twik1-related acid-sensitive  $K^+$  channel subunit TASK3 (*Kcnk9*,  $K_{2p9.1}$ ) was a major constituent of the glucose-induced channel.

To study the role of this neuronal nutrient sensor on behavior and metabolism of living animals, we developed TASK3 knock-out (KO) mice. Surprisingly, the glucose-induced hyperpolarization of orexin neurons was unaffected in these animals or even in TASK1 KO (*Kcnk3*,  $K_{2p3.1}$ ) and double TASK1/TASK3 KO mice, ruling out any functional compensation between the two TASK channel subunits. Gene inactivation of another class of halothane-activated  $K_{2p}$  channels was also without effect on glucosensing. Finally, the dose-dependent inhibition of the glucose response by low concentrations of  $Ba^{2+}$  in WT mice confirmed the absence of implication of  $K_{2p}$  channels in glucosensing by orexin neurons of the lateral hypothalamus.

## Materials and Methods

**Knock-out mice.** We targeted TASK3 gene locus for homologous recombination in 129/Sv embryonic stem (ES) cells. The vector was designed to allow cre-mediated deletion of exon 2, which encodes pore domains P1 and P2, transmembrane domains M2 to M4 as well as the cytoplasmic C-ter of TASK3. Primers were designed to amplify three contiguous DNA fragments of 6.6 kb (long arm), 1 kb (containing exon 2), and 2.9 kb (short arm) from 129/Sv genomic DNA. PCR products were subcloned into a modified pBluescript (Stratagene) containing a neomycin resistance cassette for positive selection, and thymidine kinase (TK) and diphtheria toxin (DT) genes to select against random incorporations.

Received Dec. 3, 2008; revised Jan. 20, 2009; accepted Jan. 22, 2009.

This work was supported partly by the Centre National de la Recherche Scientifique (program Origine de l'Homme, du Langage, et des Langues) and Agence Nationale pour la Recherche (ANR-08-MNP-018), the Convention Hospital Laval (05168), the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC Grant), and the Fondation pour la Recherche Médicale. F. Lesage is the recipient of a "contrat d'interface" Inserm/Centre Hospitalier Universitaire, Service de Neurologie, Hôpital Pasteur, Nice. MCH-GFP mice were kindly provided by Prof. J. M. Friedman (The Rockefeller University, New York, NY) and TASK1  $^{-/-}$  mice by Prof. W. Wisden (University of Aberdeen, Aberdeen, UK).

\*J.-L.N., J.B., and F.L. are co-senior authors.

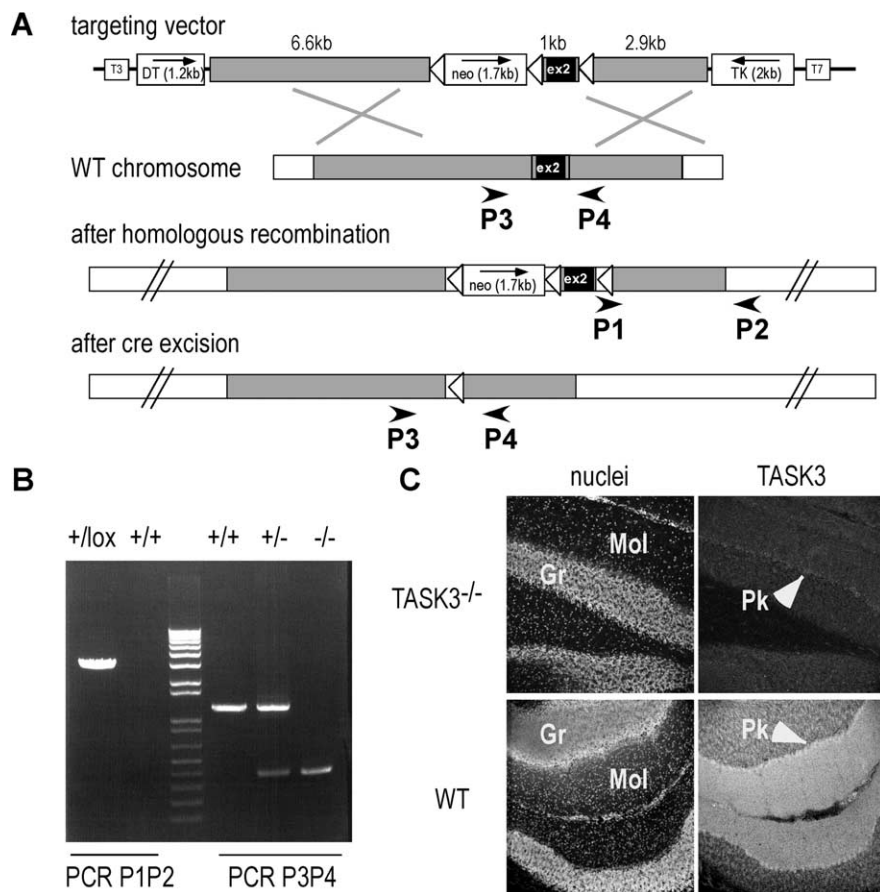
Correspondence should be addressed to Florian Lesage, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Centre National de la Recherche Scientifique, 660 Route des Lucioles, 06560 Valbonne Sophia-Antipolis, France. E-mail: lesage@ipmc.cnrs.fr.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.5764-08.2009

Copyright © 2009 Society for Neuroscience 0270-6474/09/292528-06\$15.00/0







**Figure 1.** TASK3 gene inactivation. **A**, Inactivation strategy. Open triangles represent loxP sequences. Exon 2 is deleted in KO mice. **B**, PCR analysis of genomic DNA. Primer positions are shown in **A**. **C**, TASK3 immunodetection in adult mouse cerebellum. TASK3 expression observed in the molecular layer (Mol) of wild-type (WT) mouse was lacking in KO mouse. Gr, Granule cell layer; Pk, Purkinje cells.

LoxP sites were added flanking the second exon and the neomycin resistance cassette for further gene inactivation by excision using the cre recombinase. Relative positions of these different elements are shown in Figure 1A. This construct was verified by sequencing TASK3 coding sequence, and 5' and 3' ends of long and short arms, as well as the loxP sites and the regions flanking the neo cassette. After linearization, the targeting vector was transfected by electroporation in ES cells by Genoway. DNA extracted from G418-resistant colonies was analyzed by PCR using a 5' primer overlapping the sequence junction between the loxP sequence and the 5' end of the short arm (P1, 5'-CCTGCA-GGCGCGCCGATGTAA-3') and a 3' primer external to the targeted sequence (P2, 5'-GAGACACAATAAAGTCCAGTAGTGG-3'). A positive clone was further characterized by Southern blot analysis using probes corresponding to 5' and 3' sequences flanking the targeted regions to ensure integrity of the targeted locus (data not shown). Genoway performed blastocyst injection. Chimeric animals were identified by coat color and crossed to C57BL/6J mice. Tail DNA was analyzed by PCR to select progeny bearing the floxed allele, which was then crossed to a mouse strain expressing the cre recombinase under the CMV promoter (CMV-cre). Exon 2 excision in offspring was assessed by PCR using primers flanking this region (P3, 5'-TGCGAGCTTCAG-AGAGAGGATG-3' and P4, 5'-ATGCTCTAATCTCCAGTCTG-3'). TASK<sup>-/-</sup> mice were generated by crossing TASK3<sup>-/-</sup> and TASK1<sup>-/-</sup> mice (Aller et al., 2005). Resulting TASK3<sup>+/-</sup>TASK1<sup>+/-</sup> animals were further crossed, and double KO progeny (TASK<sup>-/-</sup>) was identified by analyzing tail DNA.

TREK2 was inactivated by gene gap repair (Zheng et al., 1999). A 7.8 kb DNA fragment containing the 335 bp exon 2 of TREK2 was amplified by PCR from 129/Sv DNA and subcloned into a pBluescript (Stratagene)

containing a neomycin resistance cassette. Relative positions of these different elements are shown in Figure 4A. An internal fragment of 1.5 kb was removed by NcoI digestion, and linearized plasmid was transfected by electroporation in 129/Sv ES cells (Genoway). Genomic DNA from G418-resistant colonies was analyzed by PCR using a 5' primer absent in the targeting construct (P3, 5'-GGTCAGATGTCAGTGT-TAGGTATGTC-3') and a 3' primer internal to pBS (P4, 5'-TTAACCTCACTAAAGGG-AACAAAAG-3'). A positive colony giving the expected PCR product of 3 kb was next characterized by Southern blot analysis to ensure integrity of targeted and flanking regions (data not shown). Blastocyst injection was performed by Genoway. Chimeric animals were identified by coat color and crossed to C57BL/6J mice. Tail DNA was analyzed by PCR using P3 and P4 primers to identify the recombinant allele, and P1 (5'-CACTTCTAGCTGCTGAAATGTG-3') and P2 (5'-TCTTGGTCTGGCTCACTTGC-3') primers external to the targeted locus to identify the 8 kb wild-type allele. In the recombinant allele, P1P2 fragment is 16 kb long and was no longer amplified by PCR (see Fig. 4B). PCR was performed using Hi-Fi polymerase mix from Fermentas according to the manufacturer's specifications. Amplification conditions were 95°C/1 min; [95°C/10 s; 62°C/30 s (+1°C/cycle); 68°C/3 min] 5×; [95°C/10 s; 57°C/30 s; 68°C/3 min (+5 s/cycle)] 32×; 68°C/7 min. Mouse brain cDNAs were analyzed by PCR using primers immediately flanking exon 2 (5' primer: 5'-ATGAAATTCCAATCGAGACGCC-3' and 3' primer: 5'-GCAATGCTT-TTGCCAAAGATGGTT-3'). Multiple PCR products of 644, 979, and 1314 bp were amplified from -/- animals that correspond to alternative hybridizations from duplicated exon 2 sequences. Brain proteins were analyzed by

Western blot using anti-TREK2 affinity-purified antibodies raised in rabbits against the last 60 C-ter residues of TREK2. To get TREK<sup>-/-</sup> triple KO mice, we first prepared TREK1<sup>-/-</sup>TREK2<sup>-/-</sup> and TREK1<sup>-/-</sup>TRAAK<sup>-/-</sup> mice and then we crossed them. Resulting TREK1<sup>+/-</sup>TREK2<sup>+/-</sup>TRAAK<sup>+/-</sup> were further crossed and triple KO progeny (TREK<sup>-/-</sup>) was identified by analyzing tail DNA.

Male C57BL/6J and mutant mice were bred in the local animal facility and maintained on a 12 h dark/light cycle (7 A.M./7 P.M.) with food and water *ad libitum*. All the experiments were performed in accordance with French standard ethical guidelines for laboratory animals (Agreement number 75-178, 05/16/2000).

**Immunohistochemistry.** Immunostaining experiments were performed on C57BL/6J and TASK3<sup>-/-</sup> adult mice. They were anesthetized with pentobarbital (50 mg/kg) and perfused transcardially with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer. Brains were removed and postfixed overnight in the perfusion solution. Sixty micrometer sections were obtained on a vibratome (Leica). Free-floating slices were permeabilized for 10 min in PBS containing 1% Triton X-100 and then incubated for 30 min in the blocking solution (PBS, 5% horse serum, 0.5% Triton X-100). Slices were incubated with affinity-purified anti-TASK3 directed against its C-ter (Zanzouri et al., 2006) in the blocking solution overnight at 4°C (dilution 1:1000). After washing, slices were incubated with secondary antibodies (Alexa-488 anti-rabbit at 1:1000) and Hoechst 33342 (5 mg·ml<sup>-1</sup>) in the blocking solution for 1 h at room temperature. After washing, slices were mounted on glass coverslips and viewed on a confocal microscope (SP5, Leica).

**Brain slices for electrophysiology.** Twelve- to twenty-seven-day-old mice were anesthetized with 1% halothane. Following decapitation,



brains were rapidly removed and placed in cold phosphate/bicarbonate-buffered solution (PBBS, 4°C) composed of (in mM) 125 NaCl, 2.5 KCl, 0.4 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 25 glucose, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, pH 7.4 when bubbled with 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>. Transversal 250-μm-thick SN slices cut with a vibrating microtome (Microm) were then transferred to an incubating chamber maintained at 34°C in oxygenated PBBS. After 1 h, slices were transferred to another incubating chamber at room temperature (22–25°C) filled with PBBS containing additional CaCl<sub>2</sub> (final concentration: 2 mM). Before recording, slices were transferred to another incubating chamber filled with ACSF [glucose] containing (in mM) 125 NaCl, 2.5 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 0.2 glucose, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 10 HEPES, pH 7.3 when bubbled with 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>. The modest osmolality changes associated with changing [glucose] in ACSF were left uncompensated. When indicated, ACSF pH was modified by addition of NaOH or HCl. All the chemicals were from Sigma.

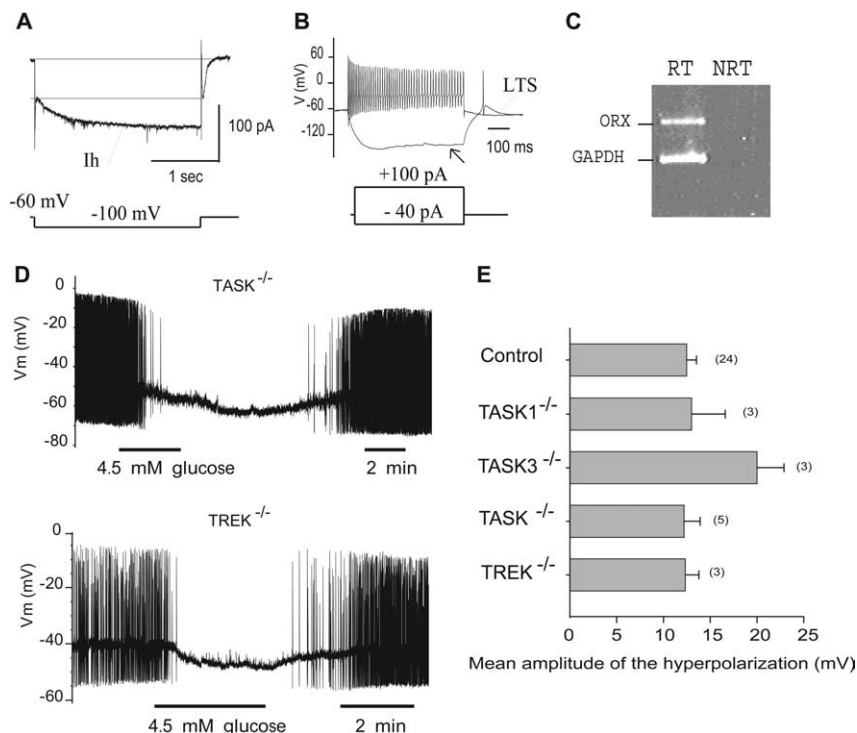
**Whole-cell patch-clamp recording and data analysis.** Brain slices were placed under a Nomarski microscope (Zeiss) equipped with infrared video camera (Axiocam, Zeiss) in a recording chamber superfused at a flow rate of 1 ml · min<sup>-1</sup> with oxygenated ACSF [glucose]. Pictures were taken by using a digital camera (Axiocam, Zeiss) connected to image-acquisition software (Axiovision). Recordings were made at room temperature (25 ± 2°C) using an Axopatch 200B (Axon Instruments). Patch-clamp pipettes made from borosilicate glass capillary (Hilgenberg) had a resistance of 4–10 MΩ when filled with the internal solution containing (mM) 130 KCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 0.1 EGTA, 5 Na<sub>2</sub>ATP, 10 HEPES (pH adjusted to 7.3 with KOH). Values of access resistance ranged from 12 to 20 MΩ and were not compensated. Measurements were made 2–3 min after obtaining the whole cell to ensure dialysis. Cell capacitance and resistance were measured in voltage clamp using the pClamp Clampex software by applying 5 mV voltage steps. Changes of extracellular solution were obtained by a fast multibarrel delivery system positioned close to the cell tested. All chemicals were from Sigma. Current-clamp recordings were made in the IClamp fast mode of the Axopatch 200B. The cytoplasm of the neuron was sucked at the end of the recording when possible.

Statistical significance between groups (average data expressed as mean ± SEM, *n* = number of neurons) was tested using either the Student's *t* test or the ANOVA followed by *t* test, and were considered significant at *p* < 0.05. Statistical analysis was done using SigmaPlot (Jandel) and Origin (Microcal) software.

## Results

### TASK3 gene targeting and knock-out

Animals bearing floxed alleles of the TASK3 second exon were generated by standard procedures (Fig. 1*A*). Resulting mice were crossed with a CMV-cre mouse strain. Successful recombination and germline transmission were confirmed by PCR (Fig. 1*B*) and Southern blot analysis (data not shown). Deletion of the sequence encoding the second exon in TASK3 mRNA was verified by RT-PCR analysis from adult brain cDNAs (data not shown). In adult mouse, TASK3 is expressed at a high level in the cerebellum (Aller et al., 2005). As expected, a strong TASK3 immunoreactivity was detected in the molecular layer of the cerebellum. This labeling was lacking in TASK3<sup>-/-</sup> mice (Fig. 1*C*). In hypo-



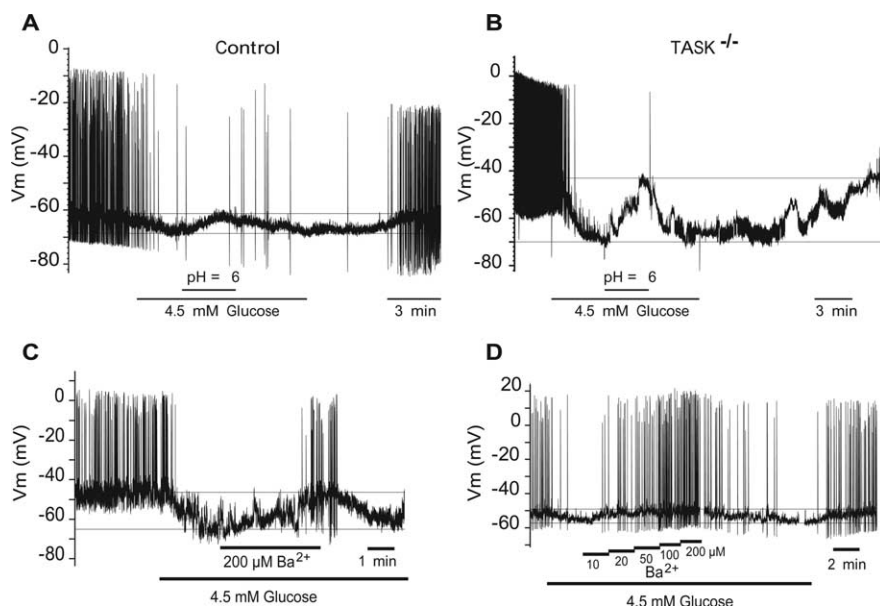
**Figure 2.** Responses to glucose of orexin neurons in K<sub>2</sub>P channel KO mice. **A**, Typical current response of an orexin neuron recorded in the voltage-clamp mode in response to a 500 ms hyperpolarizing pulse to -100 mV from a holding potential of -60 mV. Notice the presence of a slowly activating inward current (*I<sub>h</sub>*). **B**, Superimposed typical responses to depolarizing and hyperpolarizing pulses delivered from the resting potential of an orexin neuron recorded in the current-clamp mode. Notice that the discharge of action potential shows very few adaptation. **C**, Examples of typical pattern obtained in single cell multiplex RT-PCR from one presumed orexin neuron. Multiplex RT-PCR was performed as described by Guyon et al. (2005). A negative control without reverse transcriptase (NRT) was performed. **D**, Current-clamp recordings showing the effect of increases in glucose concentration from 0.2 to 4.5 mM in double TASK1<sup>-/-</sup> TASK3<sup>-/-</sup> (TASK<sup>-/-</sup>) and triple TREK1<sup>-/-</sup> TREK2<sup>-/-</sup> TRAAK<sup>-/-</sup> (TREK<sup>-/-</sup>) orexin neurons. **E**, Mean maximum amplitude (+SEM) of the hyperpolarization recorded in control and KO mice (number of neurons tested in parenthesis).

thalamic neurons, anti-TASK3 antibodies gave only a faint background labeling with no significant differences between WT and KO mice indicating that TASK3 expression is too modest in these cells to be detected by immunohistochemistry in our conditions (data not shown). TASK3<sup>-/-</sup> mice were viable and showed no obvious change in weight or size. TASK3<sup>-/-</sup> and the other mutant mice used in this study were back crossed with C57BL/6J mice for 10 generations to get mice with homogenous genetic backgrounds.

### Orexin neuron identification

To study electrical activity of orexin neurons, Burdakov et al. (2006) made transgenic mice in which the expression of eGFP is driven by the human *pre-pro-orexin* promoter (orexin-eGFP mice). Eighty percent of orexin-containing neurons in brain slices were labeled with eGFP and fluorescent and were used for electrophysiology. Here, we identified orexin neurons in acutely isolated brain slices of the hypothalamus according to electrophysiological criteria, i.e., by the presence of a hyperpolarization-activated cation current (*I<sub>h</sub>*) and a very low adaptation in action potential discharge in response to a depolarizing pulse when recording in the current-clamp mode (Fig. 2*A,B*). When it was possible, the cytoplasm was sucked at the end of recording for single-cell RT-PCR. Orexin mRNA was amplified in all presumed orexin neurons (*n* = 14) (Fig. 2*C*). Mean input resistance of the whole cells was 620 ± 93 MΩ (*n* = 36), and mean input capacitance was 55 ± 6 pF (*n* = 36). Orexin neurons usually displayed





**Figure 3.** Pharmacology of the glucose-response in orexin neurons. **A, B**, Current-clamp recordings showing the effect of external pH (pHe) on glucose-induced hyperpolarization in WT (**A**) and TASK<sup>-/-</sup> (**B**) neurons. **C, D**, Responses to glucose are reversed by Ba<sup>2+</sup>. Examples of the effects of 200  $\mu$ M Ba<sup>2+</sup> (**C**) or increasing Ba<sup>2+</sup> concentrations (**D**) are shown. Recordings were obtained in control C57BL/6J mice.

a slow hyperpolarization when glucose concentration was elevated from 0.2 mM to 4.5 mM, as described previously (Burdakov et al., 2005). This hyperpolarization was not significantly different in WT C57BL/6J mice ( $n = 6$ ) and knock-in (KI) MCH-GFP mice ( $n = 18$ ). In MCH-GFP mice, GFP expression is under the control of the MCH promoter. In the lateral hypothalamus, orexin neurons neighbor MCH neurons. In these mice, neurons expressing MCH are fluorescent and adjacent neurons, which are not fluorescent, are mainly orexin neurons (Guyon and Nahon, 2007). The properties of orexin neurons recorded in these KI mice and in C57BL/6J mice were similar thus results obtained in both strains of mice were pooled (mean amplitude of the glucose-induced hyperpolarization =  $-12.5 \pm 1.16$  mV,  $n = 24$ ).

#### Glucose inhibition in orexin neurons from TASK<sup>-/-</sup> mice

Five criteria were used to identify TASK channels as part of the glucose-sensing mechanism: a GHK current-voltage relationship, a single-channel conductance of 40 pS, channel activation by halothane and external acidification, and resistance to ruthenium red (Burdakov et al., 2006). Burdakov et al. (2006) reported that 50% of the glucose-induced hyperpolarization is blocked at pH 6.9, a value closer to those of TASK3 homodimers ( $IC_{50} = 6.7$ ) and TASK1/TASK3 heterodimers than TASK1 homodimers ( $IC_{50} = 7.3$ ). Furthermore, resistance to a ruthenium red dose that blocks TASK3 homomers as well as the unitary conductance pointed out TASK1/TASK3 heterodimers as the most plausible molecular substrates for glucosensing in orexin neurons. TASK2 is not a good candidate because in mouse brain its expression cannot be detected by Northern blot (Warth et al., 2004) or *in situ* hybridization (Aller and Wisden, 2008). Moreover, its single-channel conductance of 59.9 pS in high-K<sup>+</sup> conditions does not fit the unitary conductance of the glucose-sensitive channels in hypothalamic neurons (Reyes et al., 1998). In orexin neurons of TASK3<sup>-/-</sup> mice, we could still observe hyperpolarizations in response to glucose ( $-20 \pm 2.9$  mV,  $n = 3$ , data not shown). This response was not significantly different from that of control or

TASK1<sup>-/-</sup> mice. However, because the absence of TASK3 in KO mice could be compensated by TASK1, we also tested glucosensing in TASK1<sup>-/-</sup> mice (Aller et al., 2005). We also crossed TASK3<sup>-/-</sup> and TASK1<sup>-/-</sup> mice to obtain double TASK KO mice (hereafter termed TASK<sup>-/-</sup> mice). In TASK1<sup>-/-</sup> and TASK<sup>-/-</sup> mice, the maximum amplitude of the effect as well as the kinetics of the response were not significantly different from that of responses recorded in orexin neurons from control mice (Fig. 2D,E).

#### pH sensitivity of the glucose response in TASK<sup>-/-</sup> mice

As illustrated in Figure 3A, extracellular acid (pH = 6) reversed the effects of glucose on membrane potential in control C57BL/6J mice ( $n = 4$ ) similar to what was observed by Burdakov et al. (2006) in orexin-eGFP mice. Same effect of acidification was observed in TASK<sup>-/-</sup> mice ( $n = 4$ ) (Fig. 3B). Acid-induced depolarization was always slow with kinetics comparable to those of the glucose-induced hyperpolarization. Although the brain slice tissue has powerful endogenous pH-buffering mechanisms that could distort the response onset, this does not seem in accordance with the very rapid effect of acidification on cloned TASK1 and TASK3 channels (Duprat et al., 1997; Rajan et al., 2000). Inhibition of TASK channels is fast because it relies on protonation of a histidine residue lining the external mouth of the conduction pathway (Rajan et al., 2000). The slow kinetics of inhibition suggests that extracellular acidification has an indirect action on the intracellular pH or on the cascade linking glucose elevation to K<sup>+</sup> channel activation rather than a direct effect on the K<sup>+</sup> channels opened by glucose.

#### Glucose-induced inhibition in orexin neurons from TREK<sup>-/-</sup> KO mice

Beside pH sensitivity, activation by halothane was another strong discriminating criterion. Among K<sub>2P</sub> channels, only members of TASK and TREK subclasses are activated by the volatile anesthetic halothane at clinical doses (Patel et al., 1999; Lesage et al., 2000). TREK1 (Kcnk2, K<sub>2P</sub>2.1), TRAAK (Kcnk4, K<sub>2P</sub>4.1), and TREK2 (Kcnk10, K<sub>2P</sub>10.1) form a subfamily of mechanosensitive and polyunsaturated fatty acid-activated background K<sup>+</sup> channels. We prepared TREK2<sup>-/-</sup> mice by gene gap repair (Fig. 4A–C) and verified that TREK2 protein was not longer detectable in KO mice (Fig. 4D). We next crossed TREK2<sup>-/-</sup> mice with TREK1<sup>-/-</sup> and TRAAK<sup>-/-</sup> mice (Heurteaux et al., 2004) to get triple KO mice, termed TREK<sup>-/-</sup> mice. In TREK<sup>-/-</sup> mice, glucose-induced hyperpolarization persisted in orexin neurons ( $n = 3$ ) (Fig. 2D,E), ruling out a major contribution of these halothane-activated K<sub>2P</sub> channels in glucosensing.

#### Inhibition of the glucose response by Ba<sup>2+</sup>

K<sub>2P</sub> are not sensitive to the classical blockers of K<sup>+</sup> channels such as TEA, 4-AP, or Cs<sup>+</sup> (Lesage and Lazdunski, 2000; Lesage, 2003). They are only moderately inhibited by Ba<sup>2+</sup>, the most sensitive being TWIK1 (Kcnk1, K<sub>2P</sub>1.1) and TWIK2 (KCNK6, K<sub>2P</sub>6.1), with Ba<sup>2+</sup> concentrations inhibiting 50% of the max



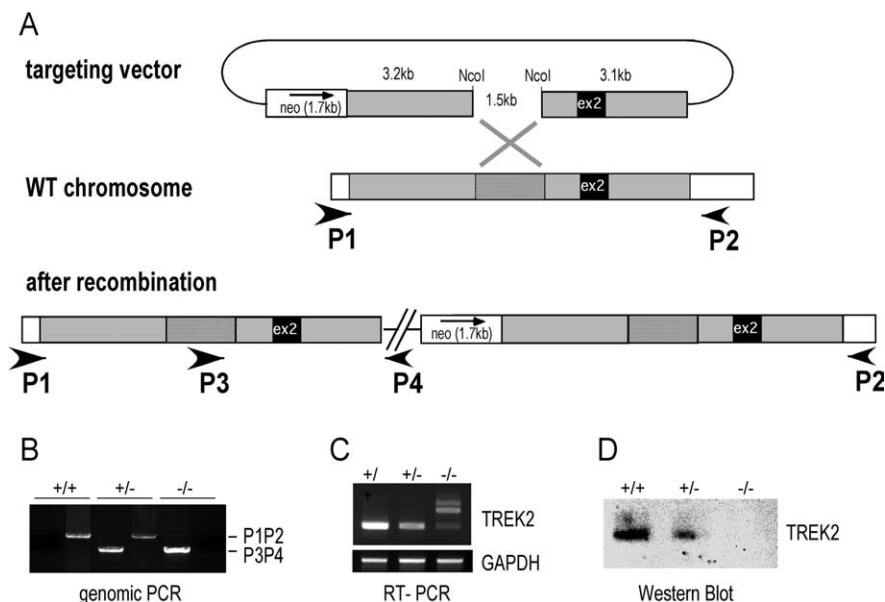


currents ( $IC_{50}$ ) around 100  $\mu M$  (Lesage et al., 1996; Patel et al., 2000).  $Ba^{2+}$   $IC_{50}$  for TASK1 and TASK3 are much more important and comprised between 300  $\mu M$  and 3 mM (for review, see Goldstein et al., 2005). We tested the effects of low concentrations of  $Ba^{2+}$  (10–200  $\mu M$ ) on glucose-induced hyperpolarization.  $Ba^{2+}$  alone had a modest depolarizing effect ( $2.00 \pm 0.63$  mV,  $n = 8$ ), suggesting that a few  $Ba^{2+}$ -sensitive  $K^+$  channels are spontaneously active in orexin neurons. In neurons in which the shift from 0.2 to 4.5 mM glucose induced a hyperpolarization of  $11.29 \pm 1.64$  mV ( $n = 17$ ),  $Ba^{2+}$  reversed glucose-induced hyperpolarization by 100% in 15 cells (Fig. 3C) and by 50% in two other neurons.  $Ba^{2+}$  (50  $\mu M$ ) was sufficient to fully reverse the glucose-induced hyperpolarization ( $n = 3$ ) (Fig. 3D). In the presence of  $Ba^{2+}$ , the effect of acidification on the glucose response was prevented ( $n = 4$ , data not shown), confirming that both treatments probably affected the same conductance. The kinetics of the  $Ba^{2+}$  block are slow. Although it is difficult to infer from kinetics of response onset when using applications in brain slice tissue, such slow response is consistent with a voltage-dependent block as previously shown for inwardly rectifying  $K^+$  channels ( $K_{ir}$ ). In these channels,  $Ba^{2+}$  binds to a site located at half the membrane span (Klein et al., 1999).

## Discussion

It has been suggested that hyperpolarizing response to glucose of hypothalamic neurons is due to the opening of TASK3-containing  $K^+$  channels, mainly based on their sensitivity to pH and halothane (Burdakov et al., 2006). Here, we have demonstrated that the hyperpolarizing response to glucose persists in orexin neurons of the lateral hypothalamus of TASK3 $^{-/-}$  mice. A similar response to glucose in double TASK $^{-/-}$  mice ruled out the eventuality of functional compensations between TASK1 and TASK3. Also, in orexin neurons of TASK $^{-/-}$  mice prepared independently, voltage-clamp studies have shown that glucose-sensitive currents were not changed (D. Burdakov, personal communication). Finally, inhibition of glucose response by low  $Ba^{2+}$  in WT mice definitely demonstrated that TASK channels are not involved in glucosensing by orexin neurons. This study and another recent one (Mulkey et al., 2007) using KO mice prove that it is still necessary to be cautious about the speculated roles of these channels regarding chemosensing and nutrient sensing.

We also have shown that halothane-activated TREK channels are not required for glucosensing. What could be the molecular nature of these glucose-sensitive  $K^+$  channels?  $Ba^{2+}$  sensitivity and kinetics of the  $Ba^{2+}$  block point out  $K_{ir}$  channels as very attractive candidates. However, the GHK current–voltage relationship of the glucose-induced conductance is not in favor of this hypothesis.  $K^+$  channels form the largest family of ion channels with 77 genes encoding pore-forming subunits (Goldstein et al., 2005; Gutman et al., 2005). Often, different subunits form heteromultimers with novel properties. Heteromultimers and homomultimers can also interact with auxiliary and regulatory subunits that themselves modify the electrophysiological and/or



**Figure 4.** TREK2 gene inactivation. **A**, Inactivation strategy. Exon 2 is duplicated in KO mice introducing a frameshift resulting in a premature stop codon. **B**, PCR analysis of genomic DNA from mutant mice. Primer positions are shown in **A**. **C**, RT-PCR analysis of brain cDNAs. Primer positions are shown in **A**. Multiple PCR products are amplified from KO animals that correspond to alternative hybridizations from the exon 2 repeat. **D**, Western analysis of adult mouse brain proteins using anti-TREK2 antibodies.

pharmacological characteristics.  $K_{2P}$  channels are not the only subunits to produce background channels. For example SK channels, KCNQ subunits associated with KCNE subunits, weakly rectifying  $K_{ir}$  channels can all produce background conductances. The glucose-induced conductance may be produced by one of these channels or by a yet uncharacterized combination of subunits and regulatory proteins. Further works, in particular a better pharmacological characterization, should help to decipher the molecular nature of the glucosensing mechanism in orexin neurons.

## References

- Aller MI, Wisden W (2008) Changes in expression of some two-pore domain potassium channel genes (KCNK) in selected brain regions of developing mice. *Neuroscience* 151:1154–1172.
- Aller MI, Veale EL, Linden AM, Sandu C, Schwaninger M, Evans LJ, Korpi ER, Mathie A, Wisden W, Brickley SG (2005) Modifying the subunit composition of TASK channels alters the modulation of a leak conductance in cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 25:11455–11467.
- Burdakov D, Gerasimenko O, Verkhratsky A (2005) Physiological changes in glucose differentially modulate the excitability of hypothalamic melanin-concentrating hormone and orexin neurons in situ. *J Neurosci* 25:2429–2433.
- Burdakov D, Jensen LT, Alexopoulos H, Williams RH, Fearon IM, O’Kelly I, Gerasimenko O, Fugger L, Verkhratsky A (2006) Tandem-pore  $K^+$  channels mediate inhibition of orexin neurons by glucose. *Neuron* 50:711–722.
- Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, Elmquist JK, Scammell T, Lee C, Richardson JA, Williams SC, Xiong Y, Kisanuki Y, Fitch TE, Nakazato M, Hammer RE, Saper CB, Yanagisawa M (1999) Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell* 98:437–451.
- Duprat F, Lesage F, Fink M, Reyes R, Heurteaux C, Lazdunski M (1997) TASK, a human background  $K^+$  channel to sense external pH variations near physiological pH. *EMBO J* 16:5464–5471.
- Goldstein SA, Bayliss DA, Kim D, Lesage F, Plant LD, Rajan S (2005) International Union of Pharmacology. LV. Nomenclature and molecular relationships of two-P potassium channels. *Pharmacol Rev* 57:527–540.
- Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stühmer W, Wang X (2005) International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular





- relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev* 57:473–508.
- Guyon A, Nahon JL (2007) Multiple actions of the chemokine stromal cell-derived factor-1 $\alpha$  on neuronal activity. *J Mol Endocrinol* 38:365–376.
- Guyon A, Banisadr G, Rovère C, Cervantes A, Kitabgi P, Melik-Parsadaniantz S, Nahon JL (2005) Complex effects of stromal cell-derived factor-1 $\alpha$  on melanin-concentrating hormone neuron excitability. *Eur J Neurosci* 21:701–710.
- Hara J, Beuckmann CT, Nambu T, Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Sugiyama F, Yagami K, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T (2001) Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron* 30:345–354.
- Heurteaux C, Guy N, Laigle C, Blondeau N, Duprat F, Mazzuca M, Lang-Lazdunski L, Widmann C, Zanzouri M, Romey G, Lazdunski M (2004) TREK-1, a K<sup>+</sup> channel involved in neuroprotection and general anesthesia. *EMBO J* 23:2684–2695.
- Ibrahim N, Bosch MA, Smart JL, Qiu J, Rubinstein M, Rønnekleiv OK, Low MJ, Kelly MJ (2003) Hypothalamic proopiomelanocortin neurons are glucose responsive and express K<sub>ATP</sub> channels. *Endocrinology* 144:1331–1340.
- Klein H, Garneau L, Coady M, Lemay G, Lapointe JY, Sauvé R (1999) Molecular characterization of an inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel from HeLa cells. *J Membr Biol* 167:43–52.
- Lesage F (2003) Pharmacology of neuronal background potassium channels. *Neuropharmacology* 44:1–7.
- Lesage F, Lazdunski M (2000) Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am J Physiol Renal Physiol* 279:F793–F801.
- Lesage F, Guillemare E, Fink M, Duprat F, Lazdunski M, Romey G, Barhanin J (1996) TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K<sup>+</sup> channel with a novel structure. *EMBO J* 15:1004–1011.
- Lesage F, Terrenoire C, Romey G, Lazdunski M (2000) Human TREK2, a 2P domain mechano-sensitive K<sup>+</sup> channel with multiple regulations by polyunsaturated fatty acids, lysophospholipids, and Gs, Gi, and Gq protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 275:28398–28405.
- Mulkey DK, Talley EM, Stornetta RL, Siegel AR, West GH, Chen X, Sen N, Mistry AM, Guyenet PG, Bayliss DA (2007) TASK channels determine pH sensitivity in select respiratory neurons but do not contribute to central respiratory chemosensitivity. *J Neurosci* 27:14049–14058.
- Patel AJ, Honoré E, Lesage F, Fink M, Romey G, Lazdunski M (1999) Inhalational anesthetics activate two-pore-domain background K<sup>+</sup> channels. *Nat Neurosci* 2:422–426.
- Patel AJ, Maingret F, Magnone V, Fosset M, Lazdunski M, Honoré E (2000) TWIK-2, an inactivating 2P domain K<sup>+</sup> channel. *J Biol Chem* 275:28722–28730.
- Rajan S, Wischmeyer E, Xin Liu G, Preisig-Müller R, Daut J, Karschin A, Derst C (2000) TASK-3, a novel tandem pore domain acid-sensitive K<sup>+</sup> channel. An extracellular histidine as pH sensor. *J Biol Chem* 275:16650–16657.
- Reyes R, Duprat F, Lesage F, Fink M, Salinas M, Farman N, Lazdunski M (1998) Cloning and expression of a novel pH-sensitive two pore domain K<sup>+</sup> channel from human kidney. *J Biol Chem* 273:30863–30869.
- Warth R, Barrière H, Meneton P, Bloch M, Thomas J, Tauc M, Heitzmann D, Romeo E, Verrey F, Mengual R, Guy N, Bendahhou S, Lesage F, Poujeol P, Barhanin J (2004) Proximal renal tubular acidosis in TASK2 K<sup>+</sup> channel-deficient mice reveals a mechanism for stabilizing bicarbonate transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:8215–8220.
- Yamanaka A, Beuckmann CT, Willie JT, Hara J, Tsujino N, Mieda M, Tomimaga M, Yagami K, Sugiyama F, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T (2003) Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. *Neuron* 38:701–713.
- Zanzouri M, Lauritzen I, Duprat F, Mazzuca M, Lesage F, Lazdunski M, Patel A (2006) Membrane potential-regulated transcription of the resting K<sup>+</sup> conductance TASK-3 via the calcineurin pathway. *J Biol Chem* 281:28910–28918.
- Zheng B, Mills AA, Bradley A (1999) A system for rapid generation of coat color-tagged knockouts and defined chromosomal rearrangements in mice. *Nucleic Acids Res* 27:2354–2360.



L'utilisation des souris invalidées pour les gènes TASK1 ou TASK3 ont permis de démontrer que ces canaux ne sont pas impliqués dans la sensibilité au glucose des neurones à orexine de l'hypothalamus. Nous avons également à notre disposition une lignée de souris qui n'expriment ni TASK1, ni TASK3, ce qui nous a permis d'éliminer immédiatement la possibilité que l'absence de l'un des canaux soit compensée par l'autre. De la même façon, nous avons montré que la sous-famille des canaux TREK1, TREK2 et TRAAK n'est pas non plus impliquée dans la réponse au glucose des neurones à orexine grâce à l'utilisation d'une lignée de souris n'exprimant ni TREK1, ni TREK2, ni TRAAK.

A ce stade seules des hypothèses peuvent être faites concernant la nature moléculaire du canal potassique à l'origine de l'hyperpolarisation dépendante du glucose dans la sous-population de neurones à orexine de l'hypothalamus.

La sensibilité au baryum et la cinétique d'inhibition du courant par le baryum suggèrent que les canaux potassiques à rectification entrante (Kir) sont de bons candidats. Cependant la courbe courant/potentiel du canal inconnu suit la relation GHK, ce qui n'est pas du tout le cas des canaux Kir. Les canaux potassiques forment la plus grande famille de canaux potassiques avec 77 gènes codant pour des sous-unités canal. Souvent différentes sous-unités s'assemblent en hétéromères, qui possèdent alors de nouvelles propriétés. De plus les homomères comme les hétéromères peuvent s'associer à des sous-unités régulatrices ou des protéines associées formant un complexe avec de nouvelles propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques. Il est possible que la conductance potassique qui se développe dans les neurones à orexine soit portée par une nouvelle combinaison de sous-unités canal associée à une ou plusieurs protéines auxiliaires.



## IV DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Mes travaux de thèse ont eu pour but d'étudier et de mieux comprendre la façon dont différents canaux appartenant à la famille des canaux potassiques à deux domaines P sont régulés. Ces canaux produisent des courants de fond aussi bien dans les neurones que dans les cellules non excitables. Ils permettent l'établissement et le maintien du potentiel de repos à des valeurs proches du potentiel d'équilibre de l'ion potassium. Leur modulation modifie par conséquent le potentiel de membrane de la cellule et l'excitabilité membranaire des neurones dans lesquels ils sont fortement exprimés. Une augmentation de l'excitabilité cellulaire correspond à une fermeture de canaux potassiques entraînant la dépolarisation de la cellule. Dans le cas d'un neurone cette dépolarisation facilite le déclenchement des potentiels d'action. A l'inverse, une diminution de l'excitabilité cellulaire qui correspond à une ouverture des canaux potassiques de fond, va produire une hyperpolarisation et défavorisera ainsi le déclenchement de potentiels d'action. Le rôle de ces canaux est donc primordial. Mieux les connaître *in vitro* mais aussi et surtout dans un contexte plus physiologique est la clé pour comprendre comment l'excitabilité cellulaire gouverne l'organisation et le fonctionnement du cerveau, mais aussi d'autres cellules non excitables. Ceci est la première étape nécessaire pour mieux appréhender les conditions pathologiques dans lesquelles l'équilibre électrique peut être modifié.

Nous avons utilisé et mis au point diverses techniques pour étudier ces régulations. Les expériences d'immunoprécipitation des complexes natifs TREK1 à partir de cerveaux de souris réalisées par le Dr Guillaume Sandoz et l'analyse par protéomique de ces complexes sont originales. En effet, l'utilisation de cerveaux de souris TREK1<sup>-/-</sup> comme contrôle de cette expérience a permis d'identifier toutes les protéines qui se fixent de façon non spécifiques sur l'anticorps, sur les billes de sépharose utilisées pour précipiter les complexes ou encore sur la colonne d'affinité. Le nombre de faux positifs obtenus par cette technique est loin d'être négligeable puisqu'une centaine de protéines a été précipitée à partir des cerveaux de souris TREK1<sup>-/-</sup>. Cette technique est donc extrêmement puissante puisqu'en comparant les protéines précipitées à partir des deux lignées de souris, nous avons identifiés des protéines qui agissent apparemment spécifiquement avec le canal TREK1. D'ailleurs seulement quatre protéines ont été identifiées et nous en avons étudié deux plus en détails.

Il s'est avéré que l'interaction entre TREK1 et ces deux protéines existe bien, tant *in vitro* qu'*in vivo*. L'association du canal avec chacune de ces deux protéines change ses propriétés : la protéine d'échafaudage AKAP-150 modifie les propriétés électrophysiologiques du canal tandis que Mtap2 augmente l'expression du canal à la



membrane plasmique. Ces deux protéines peuvent se fixer en même temps sur l'extrémité C-terminale du canal, et leurs effets sont cumulatifs.

Nous avons donc montré au cours de ces travaux que le canal TREK1 interagit avec des protéines partenaires. Ces interactions sont retrouvées aussi bien *in vitro* où nous avons pu évaluer leurs effets sur les propriétés du canal, qu'*in vivo*, où nous avons simplement montré leur existence. Ces études nous laissent en tout cas supposer que le comportement du canal TREK1 dépend de son environnement protéique. En effet, ces protéines ne sont pas exprimées dans les mêmes structures cérébrales. Dans certaines, elles sont toutes les trois présentes, et si l'interaction a bien lieu comme nous le pensons, les canaux TREK1 à la surface seront nombreux, leurs courants seront de grande taille et très peu régulés. En revanche, si TREK1 est seul, ses courants sont de faible amplitude, mais ils seront activables par un grand nombre de stimuli. Le canal TREK1 peut donc se retrouver, dans certaines structures en tout cas, au cœur d'un complexe protéique, modifiant ainsi complètement ses propriétés. Ce "nouveau" canal TREK1 est très différent de celui que nous connaissions jusqu'à présent. Il est possible que les conductances enregistrées dans les tissus natifs pour lesquelles aucune correspondance moléculaire n'est établie soient produites par des canaux associées à des protéines partenaires.

Il reste cependant à déterminer l'étendue et les conséquences physiologiques de ces interactions à l'échelle du tissu et de l'organisme. L'implication physiologique de protéines associées aux canaux ioniques a été démontré pour certains d'entre eux, notamment les canaux  $K_{ATP}$  associés aux récepteurs SUR, dont les mutations sont à l'origine de diverses pathologies. En ce qui concerne les canaux à deux domaines P, plusieurs interactions avec des protéines ont été montrées, mais aucune étude plus intégrée n'a mis en évidence les conséquences fonctionnelles de ces interactions. Il serait par exemple intéressant de connaître la proportion de canaux associés à ses protéines partenaires par rapport au nombre total de canaux exprimés. Nous savons grâce aux expériences réalisées sur les souris TREK1<sup>-/-</sup> qu'il existe dans l'organisme des canaux TREK1 fermés, donc non associés à AKAP-150, car les anesthésiques volatils produisent leur effet en les ouvrant. De même, nous savons qu'il existe des canaux TREK1 ouverts, peut-être grâce à leur association avec Mtap2 ou AKAP-150, compte tenu du phénotype observé sur les souris TREK1<sup>-/-</sup> résistantes à la dépression.

Il serait vraiment intéressant de pouvoir évaluer exactement l'impact de l'association entre TREK1 et ses protéines associées. Pour cela il faudrait fabriquer un peptide compétiteur de ces interactions capable de déstabiliser l'association entre TREK1 et AKAP-150 ou TREK1 et Mtap2 dans une cellule. Après vérification de l'efficacité de ce peptide *in vitro* puis dans des systèmes d'expression hétérologue, l'utilisation dans l'organisme entier





apporterait de nombreuses informations. Malheureusement les peptides injectés sont souvent rapidement dégradés et ne passent pas la barrière hémato-encéphalique. Parfois, le passage vers le cerveau est possible, mais la concentration en peptide retrouvée dans le cerveau est plus faible que la concentration injectée. Tous ces paramètres doivent être évalués avant toute expérience. Si le peptide compétiteur n'est pas capable de traverser la barrière hémato-encéphalique, il existe dans le commerce des vecteurs qui utilisent certains récepteurs pour transférer de petites molécules dans le cerveau.

L'ajout d'un domaine particulier sur ce peptide lui permettra ensuite de franchir la membrane plasmique des neurones afin qu'il exerce son action de compétiteur dans le cytoplasme. Ces domaines sont de petits peptides auxquels on peut greffer un peptide, un oligonucléotide ou même une protéine entière, qui ont la capacité de passer la membrane plasmique. Il existe plusieurs types de peptides ayant ces propriétés mais les plus connus sont HIV-tat (transactivator of transduction) et Antp (Antennapedia) isolé d'une protéine de drosophile (Tilstra *et al.*, 2007).

Il est également possible d'utiliser un peptide compétiteur lors d'expériences d'électrophysiologie sur tranches de cerveau. En plaçant le peptide inhibiteur dans la pipette de patch, nous pouvons enregistrer l'activité d'un neurone avant et après diffusion du peptide compétiteur. Cela permettrait de savoir, dans des conditions plus physiologiques que celles de cellules en culture, si les canaux TREK1 sont présents associés ou non à ses protéines partenaires. Ce serait ainsi la première fois que nous pourrions enregistrer les différents modes de fonctionnement du canal TREK1 dans un tissu. Cela nous permettrait également de confirmer l'interaction entre le canal et ses protéines associées *in vivo* dans diverses structures cérébrales dont les connexions sont en partie conservées dans les tranches aigües. Mais l'utilisation de peptides compétiteurs sur l'animal entier nous donnerait des indications incomparables quant au rôle de ces interactions dans des conditions physiologiques, puisque l'animal est simplement injecté avec le peptide et peut ensuite être observé et utilisé pour des expériences notamment de sensibilité aux anesthésiques, dans des tests comportementaux pour évaluer leur comportement dépressif ou non ou encore dans des tests de mémorisation.

Nous pouvons toutefois faire quelques hypothèses quant aux conséquences de ces interactions à l'échelle de l'organe et de l'individu. Nous savons qu'AKAP-150 est une protéine d'échafaudage dont le rôle majeur est de placer à proximité des protéines impliquées dans la même voie de signalisation, des protéines régulatrices telles que des kinases ou des phosphatases et les protéines qui seront modifiées par ces enzymes.... Dans le cas du canal TREK1, AKAP-150 permet de placer à proximité le canal et d'autres protéines, comme la PKA ou encore d'autres récepteurs aux neurotransmetteurs capables de le



réguler. Cela permet d'accélérer et de cibler les réactions, de phosphorylation notamment. La réponse de la cellule à un stimulus extérieur, qui peut être l'activation d'un récepteur couplé aux protéines G par son neurotransmetteur, est alors améliorée. L'ouverture ou la fermeture de ce canal potassique modifie alors rapidement l'excitabilité cellulaire, ce qui constitue la base de nombreux processus globaux : anesthésie, transmission de l'information synaptique selon des voies précises, plasticité synaptique et donc mémorisation... Il a été montré que la présence de canaux potassiques à certains embranchements synaptique permet d'empêcher la transmission de l'information du neurone pré-synaptique vers le neurone post-synaptique (Johnston *et al.*, 2003). Il est possible que la liaison de TREK1 avec AKAP-150 puisse produire ce genre d'effet. Dans les densités post-synaptiques où TREK1 est présent avec AKAP-150, le canal TREK1 sera ouvert en permanence et ses courants seront de grande amplitude. Au niveau de ces synapses, le neurone post-synaptique sera alors hyperpolarisé et le déclenchement de potentiels d'action y sera difficile et nécessitera une très forte stimulation. A l'inverse dans une synapse où TREK1 n'est pas lié à AKAP-150, le canal sera fermé et la transmission de l'information sera beaucoup plus simple. Cela permettrait de router une information neuronale en fonction de ses caractéristiques, grâce à un même canal qui selon son environnement n'aura pas le même comportement.

Les protéines associées aux microtubules sont connues pour leur rôle dans la stabilisation des microtubules et la régulation du réseau de microtubules dans les dendrites et les axones (Dehmelt and Halpain, 2005). D'après de récentes études, il semble que leur rôle soit plus important. Ces protéines sont par exemple capables de se lier non seulement aux microtubules mais aussi aux filaments d'actine, elles peuvent également recruter des protéines de signalisation et réguler le transport de vésicules le long des microtubules. La faculté de Mtap2 de se lier aux microtubules et aux filaments d'actine suggère qu'elle puisse jouer un rôle majeur dans les processus de neurogenèse, comme la formation de neurites qui nécessite la réorganisation coordonnée des réseaux d'actine et de microtubules. De plus, plusieurs études ont montré qu'une ischémie entraîne une augmentation de la neurogenèse, qui coïncide avec une augmentation de la quantité de Mtap2, en réponse à la mort neuronale (Liu *et al.*, 1998; Salazar-Colocho *et al.*, 2008). L'infection de souris par la protéine prion scrapie induit également une neurogenèse, or nous avons vu que TREK1 interagit avec la protéine prion cellulaire PrP<sup>C</sup>, précurseur physiologique de la protéine prion scrapie pathologique (PrP<sup>Sc</sup>) (Na *et al.*, 2009). Enfin, des modifications de l'état de phosphorylation de Mtap2 sont corrélées avec des phénomènes d'apprentissage, notamment dans le bulbe olfactif de souris. L'activité neuronale dans le bulbe olfactif favorise la phosphorylation de Mtap2 (Philpot *et al.*, 1997). Une fois encore, TREK1 est attendu pour avoir un rôle dans les phénomènes de mémorisation au regard de sa similitude avec le canal S de l'aplysie (Patel *et al.*, 1998). Nous voyons donc que le canal TREK1 est impliqué dans les mêmes processus que



la protéine Mtap2 avec laquelle il interagit dans les neurones, nous permettant de supposer que l'association de Mtap2 et TREK1 pourrait exister et avoir un rôle important dans le cerveau. Ceci reste entièrement à démontrer de même que le rôle de chacune de ces deux protéines dans ces phénomènes.

Il serait également intéressant d'évaluer l'étendue de l'interaction entre le canal TREK1 et ses protéines associées. Est-ce que c'est un phénomène marginal intervenant dans un très petit nombre de cellules ? Ou bien est-ce une manière globale et répandue de réguler le canal ? Est-ce que ces interactions sont présentes chez d'autres organismes et notamment chez l'homme ? Est-ce que d'autres protéines peuvent se lier à ce canal ? Dans le cerveau ? Dans d'autres organes où TREK1 est exprimé ?

La liste de protéines supposées interagir spécifiquement avec le canal TREK1, obtenue grâce à l'expérience d'immunoprécipitation comporte encore deux protéines. Il serait intéressant de les étudier puisqu'elles pourraient nous apporter de nouvelles connaissances sur le mode de fonctionnement et les régulations de ce canal. L'étude des deux premières protéines partenaires du canal TREK1 nous a laissé entrevoir que les propriétés du canal peuvent être complètement bouleversées par l'interaction avec ce type de protéines.

Les expériences d'immunoprécipitation ont été réalisées avec un anticorps spécifique du canal TREK1, mais les deux premières protéines étudiées sont capables d'interagir également avec la sous-unité TREK2 qui possède 75% d'identité avec la sous-unité TREK1.

Cependant la séquence du canal TREK2 est plus longue de 80 acides aminés par rapport à celle de TREK1 au niveau de l'extrémité C-terminale. Jusqu'à présent aucune différence notable n'a pu être observée entre les deux canaux, que ce soit au niveau de leurs caractéristiques électrophysiologiques que de leurs régulations, à l'exception de leur sensibilité au pH extracellulaire. La distribution tissulaire de même que la distribution subcellulaire des deux sous-unités est toutefois différente. La principale différence est la présence de protéines TREK2 dans le cytoplasme des cellules transfectées avec l'ADN du canal, ce qui n'est pas du tout observé dans le cas du canal TREK1, qui est lui complètement retrouvé à la membrane plasmique.

Il serait donc intéressant de pratiquer cette même expérience d'immunoprécipitation en utilisant un anticorps anti-TREK2 et les cerveaux de souris TREK2<sup>-/-</sup> comme contrôle. Nous devrions alors retrouver les protéines Mtap2 et AKAP-150 dans ces complexes, mais aussi d'autres qui pourraient interagir de façon spécifique avec la séquence de 80 acides aminés propre à TREK2. La faculté d'interagir avec des protéines différentes de celles qui s'associent



à TREK1 pourrait constituer une différence majeure entre ces deux sous-unités pour le moment si similaires.

Certaines sous-unités appartenant à la famille des canaux potassiques à deux domaines P ne sont pas fonctionnelles, comme les canaux TASK5 et KCNK7 qui ne sont pas exprimés à la membrane plasmique et dont personne n'a jamais réussi à enregistrer les courants. Il est possible que ces canaux aient besoin de l'association d'une sous-unité auxiliaire qui pourrait comme dans le cas du canal Kir<sub>6.2</sub> masquer un motif d'endocytose ou de rétention dans le réticulum et permettre leur transport vers la membrane plasmique. Cependant ces canaux qui sont retenus dans un compartiment intracellulaire pourraient également avoir un rôle dans ces compartiments. Nous savons qu'il existe des canaux qui exercent leur action au niveau de la membrane de certains organites, notamment des canaux perméables au calcium dans la mitochondrie (Hoppe, 2010), le réticulum endoplasmique ou le réticulum sarcoplasmique (Mackrill, 2010). Cela pourrait également être le cas de ces deux sous-unités, même si, à ma connaissance aucun canal potassique n'a pour le moment été décrit pour avoir un rôle intracellulaire.

Il est également possible que ces protéines, qui sont pour le moment considérées comme des canaux ioniques puissent avoir un rôle différent. En effet, ces deux sous-unités sont classées dans la famille des canaux potassiques à deux domaines P grâce à leur homologie de séquence avec les autres sous-unités K<sub>2P</sub>, et en particulier la présence potentielle de deux pores. Cependant aucun courant n'a jamais pu être enregistré. Nous pourrions alors envisager que ces protéines ne sont pas des canaux ioniques fonctionnels mais qu'ils exercent une autre fonction dans les compartiments intracellulaires où ils sont retrouvés. Il faut toutefois noter que les séquences des pores de ces deux sous-unités sont très similaires à celles des autres canaux de la famille. Il serait surprenant que ces séquences soient restées si bien conservées au cours de l'évolution si elles ne sont pas impliquées dans la fonction de la protéine.

Les autres familles de canaux potassiques comptent également des membres qui ne s'expriment pas à la membrane plasmique et pour lesquels aucune donnée n'est encore disponible. Cette technique d'immunoprécipitation pourrait être appliquée à de nombreux canaux afin d'identifier d'éventuelles protéines associées qui pourraient les réguler ou permettre leur expression à la surface. Si la souris invalidée pour le gène étudié existe, les résultats obtenus n'en seront que plus spécifiques.

En ce qui concerne le canal TWIK1 l'explication de son silence reste une source de vives polémiques.





Le laboratoire de Dr S. Goldstein poursuit son hypothèse selon laquelle le canal TWIK1 est inhibé de façon quasi-constitutive par l'interaction d'une protéine cytosolique, la protéine SUMO, au niveau de la membrane plasmique (Plant *et al.*, 2010). Ils avaient publié en 2006 un premier article dans lequel ils suggérèrent que le canal TWIK1 est présent à la membrane plasmique mais qu'il ne produit pas de courants car il est en permanence inhibé par la fixation de la protéine SUMO dans les ovocytes de xénope (Rajan *et al.*, 2005).

Puis notre laboratoire a publié deux études consécutives (Felicangeli *et al.*, 2007; Felicangeli *et al.*, 2010). En 2007, le Dr Felicangeli a montré que le canal n'est pas sumoylé aussi bien dans les ovocytes de xénope que dans les cellules de mammifères. Cette année nous avons publié de nouveaux travaux qui prouvent cette fois que le canal TWIK1 n'est pas présent à la membrane plasmique des cellules qui l'expriment. Il est en fait retenu dans un compartiment de recyclage situé juste en dessous de la bordure en brosse des cellules polarisées. Nous avons également démontré qu'il existe un signal d'endocytose (deux isoleucine en positions 293 et 294) dans la séquence du canal TWIK1 au niveau de son extrémité C-terminale, qui induit l'internalisation constitutive du canal. Les canaux nouvellement synthétisés sont insérés dans la membrane plasmique mais sont très rapidement internalisés et transférés dans les endosomes de recyclage. La diminution de la concentration intracellulaire d'AMPC provoquée par l'activation de récepteurs couplés aux protéines G<sub>i</sub> entraîne une augmentation des courants TWIK1, probablement en ralentissant l'internalisation des canaux néosynthétisés insérés dans la membrane plasmique.

Cependant toutes ces expériences ont été effectuées dans des systèmes d'expression hétérologues dans lesquels le canal TWIK1 et parfois le récepteur couplé à la protéine G<sub>i</sub> sont transfectés et donc surexprimés. Il serait intéressant de pouvoir enregistrer l'augmentation d'un courant potassique dans des systèmes natifs en réponse à l'activation de récepteurs couplés à la protéine G<sub>i</sub>. Cela a déjà été réalisé dans les neurones du cortex entorhinal (Deng *et al.*, 2007) dans lesquels l'application de sérotonine provoque une inhibition de l'excitabilité neuronale. Ce groupe a avancé l'hypothèse que cette conductance pouvait être portée par le canal TWIK1. Il serait toutefois informatif de pouvoir enregistrer de nouveau cette activation dans d'autres tissus qui expriment également le canal TWIK1. Il est cependant difficile d'identifier clairement l'identité du canal responsable d'un tel courant, en particulier lorsqu'il s'agit de canaux de fond, qui ont une pharmacologie limitée et très peu spécifique. Nous pourrions réaliser ces expériences en parallèle dans des cellules issues de souris sauvages et comparer la réponse obtenue à celle de cellules issues de souris TWIK1<sup>-/-</sup>.

Il serait également extrêmement utile d'avoir une meilleure connaissance des régulations et de la pharmacologie du canal TWIK1. Cela est désormais envisageable grâce



au canal muté TWIK1I293A,I294A, qui est exprimé à la membrane plasmique et qui produit des courants facilement enregistrables. Les seules connaissances que nous avons actuellement de la façon dont TWIK1 est régulé viennent des ovocytes de xénope où les courants enregistrés sont certes plus élevés que dans les cellules de mammifères mais toujours faibles. J'ai débuté une étude de caractérisation des courants TWIK1I293A,I294A par différents agents pharmacologiques ou phénomènes physiologiques. J'ai notamment testé le rouge de ruthénium (5 $\mu$ M) qui inhibe les canaux TASK, mais qui n'a aucun effet sur les canaux TWIK1I293A,I294A. J'ai également appliqué sur ces cellules 500  $\mu$ M d'AMPC perméant capable de traverser la membrane plasmique. Après 3 minutes d'application, les courants TWIK1I293A,I294A sont légèrement inhibés et le potentiel de membrane est largement augmenté, passant de -50mV à -25mV. Lorsqu'un canal potassique se ferme, les ions potassium chargés positivement s'accumulent à l'intérieur de la cellule et provoquent une dépolarisation. Cela est tout à fait en accord avec les résultats que nous avons obtenus concernant l'insertion des canaux TWIK1 dans la membrane plasmique et l'augmentation des courants induits par une diminution de la concentration intracellulaire d'AMPC. De nombreuses autres substances pharmacologiques restent à tester et il serait vraiment intéressant et utile de connaître un agent pharmacologique ou un mode de régulation capable d'inhiber et d'activer le canal de façon spécifique. Cela permettra d'identifier beaucoup plus facilement les courants TWIK1 dans les systèmes natifs, et de comprendre un peu mieux les rôles physiologiques de ce canal qui sont encore pour le moment largement méconnus.

Le trafic intracellulaire du canal TWIK1 reste également en grande partie méconnu. Nous avons vu qu'il s'accumule dans les endosomes de recyclage sous la membrane plasmique. Ces compartiments sont riches en Vamp8 et Rab11, avec lesquelles TWIK1 colocalise très bien. Cependant les protéines qui sont internalisées depuis la membrane plasmique ne sont pas dirigées vers les endosomes de recyclage mais vers les endosomes précoces, qui sont eux riches en Rab5. Ces protéines vont être ensuite dirigées vers les lysosomes pour être dégradées ou bien vers les endosomes de recyclage en fonction des signaux présents sur la séquence de la protéine. Nous avons repéré le signal d'internalisation du canal TWIK1, qui est un motif composé de deux isoleucines, mais ce signal permet d'envoyer les canaux dans les endosomes précoces. Or nous le retrouvons dans les endosomes de recyclage ce qui indique que le passage par les endosomes précoces est très transitoire. Il existe donc un autre signal sur la séquence du canal qui permet ce second transport que nous n'avons pour le moment pas identifié.

Ce signal est activement recherché par le Dr Feliciangeli par une approche de mutagenèse et de chimères, dans lesquelles il remplace progressivement des tronçons de séquences de TWIK1 par TASK3 et inversement, dans l'espoir que l'un de ces mutants



entraîne l'expression à la surface de TWIK1 ou la rétention de TASK3 dans les endosomes. Si un tel phénotype était observé, cela indiquerait que la séquence mutée contient un signal d'adressage.

De plus le trafic intracellulaire du canal TWIK1 pourrait servir de base et de modèle pour comprendre l'adressage d'autres protéines membranaires qui sont internalisées et recyclées de la même manière mais pour lesquelles on ne comprend pas bien les mécanismes physiologiques régulateurs. Le canal chlorure CFTR est lui aussi rapidement internalisé quand il est présent à la membrane plasmique. Il est retrouvé dans les endosomes précoces, puis une partie des protéines est envoyée vers les lysosomes où elles seront dégradées alors qu'une autre partie est retrouvée dans les endosomes de recyclage où elles seront recyclées et insérées de nouveau dans la membrane plasmique. Les mécanismes et les signaux régulant le trafic du CFTR vers ces différents compartiments intracellulaires sont encore méconnus de même que le signal déclenchant le recyclage et la sortie des endosomes de recyclage.

Le canal TWIK1 pourrait donc servir de modèle pour comprendre les mécanismes du trafic intracellulaire d'autres protéines transmembranaires et pourrait également devenir un marqueur de cette voie.

Au-delà de l'explication cellulaire de l'absence d'activité du canal TWIK1 dans les systèmes d'expression hétérologue, c'est le rôle de ce canal au niveau de l'organisme que nous cherchons à comprendre. Cette sous-unité est très largement exprimée dans le cerveau et dans d'autres organes périphériques, comme le cœur, les reins ou les poumons. L'étude des souris TWIK1<sup>-/-</sup> ne nous a pas apporté beaucoup de renseignements puisque hormis les problèmes de diurèse et de réabsorption du phosphate, les souris se comportent normalement, se reproduisent bien... Cependant au vu de la distribution tissulaire et avec ce que nous connaissons des canaux de fond et de leur rôle dans l'excitabilité cellulaire, nous nous attendions à des conséquences plus importantes. Le rôle du canal TWIK1 est peut-être dépendant de conditions particulières. Nous avons montré que l'activation des récepteurs couplés G<sub>i</sub> augmente les courants TWIK1 dans un système hétérologue. Il reste alors à comprendre quelle est l'implication physiologique de cela. Quels sont les stimuli, les voies de signalisation... capables d'activer les protéines couplées G<sub>i</sub> ? Et quelle incidence cela peut avoir sur l'excitabilité cellulaire ?

Nous pouvons une fois encore seulement faire des suppositions concernant le rôle de ce canal. L'augmentation des courants TWIK1 est lente en réponse à l'activation d'un récepteur couplé G<sub>i</sub>, ce qui est incompatible avec tous les mécanismes nécessitant une adaptation rapide de l'excitabilité cellulaire, comme la transmission synaptique. TWIK1 pourrait donc intervenir dans des modifications plus lentes, mais aussi plus durables de



l'excitabilité cellulaire, en réponse à l'imprégnation par une hormone par exemple, ou bien dans des processus de plasticité synaptique dans lesquels c'est une stimulation répétée qui produit un effet durable.

A l'heure actuelle, la seule méthode que nous pourrions utiliser pour évaluer les effets de  $G_i$  sur le canal TWIK1 et sur l'excitabilité cellulaire serait d'activer des récepteurs couplés à la protéine  $G_i$  à l'échelle de l'individu. Nous pourrions par exemple injecter à un animal de la clonidine, un agoniste du récepteur  $\alpha_2$ -AR, et observer des changements éventuels de son comportement ou de sa physiologie. Nous savons que TWIK1 est présent dans le cerveau, une modification de ses conductances pourrait entraîner des changements de comportement, sa présence dans le cœur pourrait moduler le rythme cardiaque, et son expression dans le rein peut, comme nous l'avons déjà vu modifier l'homéostasie de ses excréments.... Cependant, le problème majeur que nous risquons de rencontrer est la non-spécificité de l'action de la clonidine. Ce composé va activer tous les récepteurs  $\alpha_2$ -AR de l'organisme, qui vont par la suite activer des protéines  $G_i$ . Cependant les effets de  $G_i$  sont très nombreux, et touchent une multitude de protéines. Les conductances TWIK1 seront augmentées mais l'activation de la PKA par la diminution de la concentration intracellulaire d'AMPc va modifier de nombreuses autres protéines dont beaucoup de canaux ioniques. Il sera très difficile d'identifier les effets de l'activation spécifique de TWIK1.

Une méthode alternative serait d'appliquer de la clonidine sur des tranches de cerveau de souris. Les effets sur les courants TWIK1 seraient également masqués par un bruit de fond correspondant à l'activation de protéines  $G_i$ , qui serait certainement moins important que dans un animal entier. Il serait peut-être plus simple dans ces conditions d'identifier les effets spécifiques sur TWIK1 grâce notamment à l'utilisation de souris TWIK1<sup>-/-</sup>.

Nous voyons tout de même apparaître un mécanisme commun à la régulation de l'excitabilité cellulaire dans diverses régions du cerveau. Effectivement, ce n'est pas la première fois que les récepteurs couplés à la protéine  $G_i$  sont impliqués dans la modulation de l'excitabilité cellulaire par l'intermédiaire de canaux potassiques. Dans chaque cas,  $G_i$  est impliqué mais les voies de signalisation et les conséquences sur le canal sont différentes.

Les canaux GIRK sont activés par la liaison directe de la protéine  $G_i$  (voir §II.2.2) dans les neurones (Luscher and Slesinger, 2010). Ces canaux sont au centre d'un complexe multiprotéique contenant un récepteur activé par un neurotransmetteur et couplé à la protéine  $G_i$ , comme le récepteur GABA<sub>B</sub>, le canal GIRK et éventuellement d'autres protéines régulatrices comme les protéines RGS. Ce mode d'activation des canaux GIRK est à l'origine des potentiels lents inhibiteurs post-synaptiques.





Les canaux TREK2 neuronaux sont également régulés par les protéines  $G_i$  mais d'une façon indirecte (Deng *et al.*, 2009). Ce canal est ouvert par la déphosphorylation de la sérine en position 359 par la PKA. Il a été montré que l'activation de récepteurs  $GABA_B$  couplés à la protéine  $G_i$  dans le cortex entorhinal inhibe l'adénylate cyclase, qui entraîne une diminution de la concentration intracellulaire en AMPc ce qui a pour conséquence d'abaisser l'activité de la PKA. Cela aboutit donc à l'ouverture des canaux TREK2, ce qui va diminuer l'excitabilité du neurone. L'équipe du Dr Lei a montré que l'injection de baclofen, un activateur des récepteurs  $GABA_B$ , dans le cortex entorhinal modifie les capacités d'apprentissage spatial des animaux. L'activation indirecte d'un canal potassique par l'intermédiaire de la protéine  $G_i$  est donc impliquée dans un mécanisme de mémorisation dont la base moléculaire est une forme de plasticité synaptique.

Et enfin, nous avons montré une troisième forme de régulation de l'excitabilité cellulaire par la protéine  $G_i$  grâce à l'insertion du canal potassique TWIK1 dans la membrane plasmique des cellules qui l'expriment.

Nous voyons ainsi se dessiner un mode de régulation général de l'excitabilité cellulaire, par l'intermédiaire de divers canaux potassiques, activés par diverses méthodes, mais pour tous, la protéine  $G_i$  est à l'origine de cette régulation.

Mon travail de thèse apporte donc de nouvelles connaissances sur les modes de régulation de quelques canaux de la famille des canaux potassiques à deux domaines P. L'interaction avec des protéines associées permet d'apporter un niveau de régulation supplémentaire aux canaux TREK, en modifiant leur adressage et/ou leurs propriétés électrophysiologiques. Ce qu'il faut surtout retenir c'est la possibilité, grâce à l'interaction de diverses protéines, de "fabriquer" un nouveau canal avec de nouvelles propriétés et ceci en fonction de l'environnement protéique. Cela permet d'apporter encore plus de diversité à cette famille de canaux qui est déjà la plus grande d'un point de vue génique.

Une connaissance précise du fonctionnement et des régulations de ces différents canaux permettra également de mieux comprendre leurs rôles physiologiques à l'échelle de l'individu et leur éventuelle implication dans des phénomènes pathologiques.



## BIBLIOGRAPHIE

1. Abbott, G. W., M. H. Butler, S. Bendahhou, M. C. Dalakas, L. J. Ptacek and S. A. Goldstein (2001). "MiRP2 forms potassium channels in skeletal muscle with Kv3.4 and is associated with periodic paralysis." Cell **104**(2): 217-31.
2. Abbott, G. W. and S. A. Goldstein (2001). "Potassium channel subunits encoded by the KCNE gene family: physiology and pathophysiology of the Mink-related peptides (MiRPs)." Mol Interv **1**(2): 95-107.
3. Aguilar-Bryan, L., J. P. t. Clement and D. A. Nelson (1998). "Sulfonylurea receptors and ATP-sensitive potassium ion channels." Methods Enzymol **292**: 732-44.
4. Aguilar-Bryan, L., C. G. Nichols, S. W. Wechsler, J. P. t. Clement, A. E. Boyd, 3rd, G. Gonzalez, H. Herrera-Sosa, K. Nguy, J. Bryan and D. A. Nelson (1995). "Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion." Science **268**(5209): 423-6.
4. Aittoniemi, J., C. Fotinou, T. J. Craig, H. de Wet, P. Proks and F. M. Ashcroft (2009). "Review. SUR1: a unique ATP-binding cassette protein that functions as an ion channel regulator." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **364**(1514): 257-67.
5. Al-Bassam, J., R. S. Ozer, D. Safer, S. Halpain and R. A. Milligan (2002). "MAP2 and tau bind longitudinally along the outer ridges of microtubule protofilaments." J Cell Biol **157**(7): 1187-96.
6. Aleksandrov, A. A., L. A. Aleksandrov and J. R. Riordan (2007). "CFTR (ABCC7) is a hydrolyzable-ligand-gated channel." Pflugers Arch **453**(5): 693-702.
7. Alewine, C., B. Y. Kim, V. Hegde and P. A. Welling (2007). "Lin-7 targets the Kir 2.3 channel on the basolateral membrane via a L27 domain interaction with CASK." Am J Physiol Cell Physiol **293**(6): C1733-41.
8. Aller, M. I. and W. Wisden (2008). "Changes in expression of some two-pore domain potassium channel genes (KCNK) in selected brain regions of developing mice." Neuroscience **151**(4): 1154-72.
9. Alloui, A., K. Zimmermann, J. Mamet, F. Duprat, J. Noel, J. Chemin, N. Guy, N. Blondeau, N. Voilley, C. Rubat-Coudert, M. Borsotto, G. Romey, C. Heurteaux, P. Reeh, A. Eschalier and M. Lazdunski (2006). "TREK-1, a K<sup>+</sup> channel involved in polymodal pain perception." EMBO J **25**(11): 2368-76.
10. Amarillo, Y., J. A. De Santiago-Castillo, K. Dougherty, J. Maffie, E. Kwon, M. Covarrubias and B. Rudy (2008). "Ternary Kv4.2 channels recapitulate voltage-dependent inactivation kinetics of A-type K<sup>+</sup> channels in cerebellar granule neurons." J Physiol **586**(8): 2093-106.
11. Amoroso, S., H. Schmid-Antomarchi, M. Fosset and M. Lazdunski (1990). "Glucose, sulfonylureas, and neurotransmitter release: role of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels." Science **247**(4944): 852-4.
12. An, W. F., M. R. Bowlby, M. Betty, J. Cao, H. P. Ling, G. Mendoza, J. W. Hinson, K. I. Mattsson, B. W. Strassle, J. S. Trimmer and K. J. Rhodes (2000). "Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors." Nature **403**(6769): 553-6.
13. Angelo, K., T. Jespersen, M. Grunnet, M. S. Nielsen, D. A. Klaerke and S. P. Olesen (2002). "KCNE5 induces time- and voltage-dependent modulation of the KCNQ1 current." Biophys J **83**(4): 1997-2006.



14. Arnold, D. B. and D. E. Clapham (1999). "Molecular determinants for subcellular localization of PSD-95 with an interacting K<sup>+</sup> channel." *Neuron* **23**(1): 149-57.
15. Arrighi, I., F. Lesage, J. C. Scimeca, G. F. Carle and J. Barhanin (1998). "Structure, chromosome localization, and tissue distribution of the mouse *twik* K<sup>+</sup> channel gene." *FEBS Lett* **425**(2): 310-6.
16. Ashcroft, F. M., S. J. Ashcroft and D. E. Harrison (1988). "Properties of single potassium channels modulated by glucose in rat pancreatic beta-cells." *J Physiol* **400**: 501-27.
17. Ashcroft, F. M. and F. M. Gribble (1998). "Correlating structure and function in ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels." *Trends Neurosci* **21**(7): 288-94.
19. Ashcroft, F. M. and F. M. Gribble (2000). "New windows on the mechanism of action of K(ATP) channel openers." *Trends Pharmacol Sci* **21**(11): 439-45.
20. Ashcroft, F. M. and M. Kakei (1989). "ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in rat pancreatic beta-cells: modulation by ATP and Mg<sup>2+</sup> ions." *J Physiol* **416**: 349-67.
21. Ashcroft, F. M. and P. Rorsman (1989). "Electrophysiology of the pancreatic beta-cell." *Prog Biophys Mol Biol* **54**(2): 87-143.
22. Ashford, M. L., C. T. Bond, T. A. Blair and J. P. Adelman (1994). "Cloning and functional expression of a rat heart KATP channel." *Nature* **370**(6489): 456-9.
23. Ashford, M. L., N. C. Sturgess, N. J. Trout, N. J. Gardner and C. N. Hales (1988). "Adenosine-5'-triphosphate-sensitive ion channels in neonatal rat cultured central neurones." *Pflugers Arch* **412**(3): 297-304.
24. Ashmole, I., P. A. Goodwin and P. R. Stanfield (2001). "TASK-5, a novel member of the tandem pore K<sup>+</sup> channel family." *Pflugers Arch* **442**(6): 828-33.
25. Atkinson, N. S., G. A. Robertson and B. Ganetzky (1991). "A component of calcium-activated potassium channels encoded by the *Drosophila slo* locus." *Science* **253**(5019): 551-5.
26. Azzalin, A., V. Ferrara, A. Arias, S. Cerri, D. Avella, M. B. Pisu, R. Nano, G. Bernocchi, L. Ferretti and S. Comincini (2006). "Interaction between the cellular prion (PrP<sup>C</sup>) and the 2P domain K<sup>+</sup> channel TREK-1 protein." *Biochem Biophys Res Commun* **346**(1): 108-15.
27. Ballanyi, K. (2004). "Protective role of neuronal KATP channels in brain hypoxia." *J Exp Biol* **207**(Pt 18): 3201-12.
28. Bang, H., Y. Kim and D. Kim (2000). "TREK-2, a new member of the mechanosensitive tandem-pore K<sup>+</sup> channel family." *J Biol Chem* **275**(23): 17412-9.
29. Bao, L. and D. H. Cox (2005). "Gating and ionic currents reveal how the BKCa channel's Ca<sup>2+</sup> sensitivity is enhanced by its beta1 subunit." *J Gen Physiol* **126**(4): 393-412.
30. Barhanin, J., F. Lesage, E. Guillemare, M. Fink, M. Lazdunski and G. Romey (1996). "K(V)LQT1 and Isk (minK) proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current." *Nature* **384**(6604): 78-80.
31. Basso, C., P. Labarca, E. Stefani, O. Alvarez and R. Latorre (1998). "Pore accessibility during C-type inactivation in Shaker K<sup>+</sup> channels." *FEBS Lett* **429**(3): 375-80.
32. Bayliss, D. A., J. E. Sirois and E. M. Talley (2003). "The TASK family: two-pore domain background K<sup>+</sup> channels." *Mol Interv* **3**(4): 205-19.
33. Bayliss, D. A., E. M. Talley, J. E. Sirois and Q. Lei (2001). "TASK-1 is a highly modulated pH-sensitive 'leak' K(+) channel expressed in brainstem respiratory neurons." *Respir Physiol* **129**(1-2): 159-74.



34. Bearzatto, B., F. Lesage, R. Reyes, M. Lazdunski and P. M. Laduron (2000). "Axonal transport of TREK and TRAAK potassium channels in rat sciatic nerves." Neuroreport **11**(5): 927-30.
35. Bendahhou, S., C. Marionneau, K. Haurogne, M. M. Larroque, R. Derand, V. Szuts, D. Escande, S. Demolombe and J. Barhanin (2005). "In vitro molecular interactions and distribution of KCNE family with KCNQ1 in the human heart." Cardiovasc Res **67**(3): 529-38.
36. Bentrop, D., M. Beyermann, R. Wissmann and B. Fakler (2001). "NMR structure of the "ball-and-chain" domain of KCNMB2, the beta 2-subunit of large conductance Ca<sup>2+</sup>- and voltage-activated potassium channels." J Biol Chem **276**(45): 42116-21.
37. Bernstein, J. (1902). "Untersuchungen zur Thermodynamik der bioelektrischen Ströme." Pflugers Arch **92**: 521-562.
38. Bezanilla, F. (2002). "Voltage sensor movements." J Gen Physiol **120**(4): 465-73.
39. Bhatnagar, A., R. Kumar, S. M. Tipparaju and S. Q. Liu (2003). "Differential pyridine nucleotide coenzyme binding to the beta-subunit of the voltage-sensitive K<sup>+</sup> channel: a mechanism for redox regulation of excitability?" Chem Biol Interact **143-144**: 613-20.
40. Bockenhauer, D., N. Zilberberg and S. A. Goldstein (2001). "KCNK2: reversible conversion of a hippocampal potassium leak into a voltage-dependent channel." Nat Neurosci **4**(5): 486-91.
41. Bond, C. T., M. Pessia, X. M. Xia, A. Lagrutta, M. P. Kavanaugh and J. P. Adelman (1994). "Cloning and expression of a family of inward rectifier potassium channels." Receptors Channels **2**(3): 183-91.
42. Bonifacino, J. S. and L. M. Traub (2003). "Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes." Annu Rev Biochem **72**: 395-447.
43. Borsotto, M., L. Cavarec, M. Bouillot, G. Romey, F. Macchiardi, A. Delaye, M. Nasroune, M. Bastucci, J. L. Sambucy, J. J. Luan, A. Charpagne, V. Jouet, R. Leger, M. Lazdunski, D. Cohen and I. Chumakov (2007). "PP2A-Bgamma subunit and KCNQ2 K<sup>+</sup> channels in bipolar disorder." Pharmacogenomics J **7**(2): 123-32.
44. Brenner, R., Q. H. Chen, A. Vilaythong, G. M. Toney, J. L. Noebels and R. W. Aldrich (2005). "BK channel beta4 subunit reduces dentate gyrus excitability and protects against temporal lobe seizures." Nat Neurosci **8**(12): 1752-9.
45. Brenner, R., G. J. Perez, A. D. Bonev, D. M. Eckman, J. C. Kosek, S. W. Wiler, A. J. Patterson, M. T. Nelson and R. W. Aldrich (2000). "Vasoregulation by the beta1 subunit of the calcium-activated potassium channel." Nature **407**(6806): 870-6.
46. Brown, D. A., A. Constanti and P. R. Adams (1981). "Slow cholinergic and peptidergic transmission in sympathetic ganglia." Fed Proc **40**(11): 2625-30.
47. Bryan, J. and L. Aguilar-Bryan (1997). "The ABCs of ATP-sensitive potassium channels: more pieces of the puzzle." Curr Opin Cell Biol **9**(4): 553-9.
48. Buckler, K. J. (1997). "A novel oxygen-sensitive potassium current in rat carotid body type I cells." J Physiol **498** ( Pt 3): 649-62.
49. Burdakov, D., O. Gerasimenko and A. Verkhratsky (2005). "Physiological changes in glucose differentially modulate the excitability of hypothalamic melanin-concentrating hormone and orexin neurons in situ." J Neurosci **25**(9): 2429-33.
50. Burdakov, D., L. T. Jensen, H. Alexopoulos, R. H. Williams, I. M. Fearon, I. O'Kelly, O. Gerasimenko, L. Fugger and A. Verkhratsky (2006). "Tandem-pore K<sup>+</sup> channels mediate inhibition of orexin neurons by glucose." Neuron **50**(5): 711-22.





51. Burgoyne, R. D. (2007). "Neuronal calcium sensor proteins: generating diversity in neuronal Ca<sup>2+</sup> signalling." *Nat Rev Neurosci* **8**(3): 182-93.
52. Bushell, T., C. Clarke, A. Mathie and B. Robertson (2002). "Pharmacological characterization of a non-inactivating outward current observed in mouse cerebellar Purkinje neurones." *Br J Pharmacol* **135**(3): 705-12.
53. Byrne, J. H. and E. R. Kandel (1996). "Presynaptic facilitation revisited: state and time dependence." *J Neurosci* **16**(2): 425-35.
54. Cai, S. Q., K. H. Park and F. Sesti (2006). "An evolutionarily conserved family of accessory subunits of K<sup>+</sup> channels." *Cell Biochem Biophys* **46**(1): 91-9.
55. Chandy, K. G. and G. A. Gutman (1993). "Nomenclature for mammalian potassium channel genes." *Trends Pharmacol Sci* **14**(12): 434.
56. Charlier, C., N. A. Singh, S. G. Ryan, T. B. Lewis, B. E. Reus, R. J. Leach and M. Leppert (1998). "A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family." *Nat Genet* **18**(1): 53-5.
57. Chemin, J., C. Girard, F. Duprat, F. Lesage, G. Romey and M. Lazdunski (2003). "Mechanisms underlying excitatory effects of group I metabotropic glutamate receptors via inhibition of 2P domain K<sup>+</sup> channels." *EMBO J* **22**(20): 5403-11.
58. Chemin, J., A. J. Patel, F. Duprat, I. Lauritzen, M. Lazdunski and E. Honore (2005). "A phospholipid sensor controls mechanogating of the K<sup>+</sup> channel TREK-1." *EMBO J* **24**(1): 44-53.
59. Chen, M., G. Gan, Y. Wu, L. Wang and J. Ding (2008). "Lysine-rich extracellular rings formed by hbeta2 subunits confer the outward rectification of BK channels." *PLoS One* **3**(5): e2114.
60. Chung, H. J., W. P. Ge, X. Qian, O. Wiser, Y. N. Jan and L. Y. Jan (2009). "G protein-activated inwardly rectifying potassium channels mediate depotentiation of long-term potentiation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(2): 635-40.
61. Chung, H. J., X. Qian, M. Ehlers, Y. N. Jan and L. Y. Jan (2009). "Neuronal activity regulates phosphorylation-dependent surface delivery of G protein-activated inwardly rectifying potassium channels." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(2): 629-34.
62. Clancy, S. M., C. E. Fowler, M. Finley, K. F. Suen, C. Arrabit, F. Berton, T. Kosaza, P. J. Casey and P. A. Slesinger (2005). "Pertussis-toxin-sensitive G $\alpha$  subunits selectively bind to C-terminal domain of neuronal GIRK channels: evidence for a heterotrimeric G-protein-channel complex." *Mol Cell Neurosci* **28**(2): 375-89.
63. Clement, J. P. t., K. Kunjilwar, G. Gonzalez, M. Schwanstecher, U. Panten, L. Aguilar-Bryan and J. Bryan (1997). "Association and stoichiometry of K(ATP) channel subunits." *Neuron* **18**(5): 827-38.
64. Coetzee, W. A., Y. Amarillo, J. Chiu, A. Chow, D. Lau, T. McCormack, H. Moreno, M. S. Nadal, A. Ozaita, D. Pountney, M. Saganich, E. Vega-Saenz de Miera and B. Rudy (1999). "Molecular diversity of K<sup>+</sup> channels." *Ann N Y Acad Sci* **868**: 233-85.
65. Cohen, A., R. Sagron, E. Somech, Y. Segal-Hayoun and N. Zilberberg (2009). "Pain-associated signals, acidosis and lysophosphatidic acid, modulate the neuronal K(2P)2.1 channel." *Mol Cell Neurosci* **40**(3): 382-9.
66. Cohen, N. A., J. E. Brenman, S. H. Snyder and D. S. Brecht (1996). "Binding of the inward rectifier K<sup>+</sup> channel Kir 2.3 to PSD-95 is regulated by protein kinase A phosphorylation." *Neuron* **17**(4): 759-67.
67. Cole, W. C., C. D. McPherson and D. Sontag (1991). "ATP-regulated K<sup>+</sup> channels protect the myocardium against ischemia/reperfusion damage." *Circ Res* **69**(3): 571-81.



68. Colledge, M. and J. D. Scott (1999). "AKAPs: from structure to function." Trends Cell Biol **9**(6): 216-21.
69. Connor, J. X., K. McCormack, A. Pletsch, S. Gaeta, B. Ganetzky, S. Y. Chiu and A. Messing (2005). "Genetic modifiers of the Kv beta2-null phenotype in mice." Genes Brain Behav **4**(2): 77-88.
70. Connors, N. C., M. E. Adams, S. C. Froehner and P. Kofuji (2004). "The potassium channel Kir4.1 associates with the dystrophin-glycoprotein complex via alpha-syntrophin in glia." J Biol Chem **279**(27): 28387-92.
71. Cook, D. L., L. S. Satin, M. L. Ashford and C. N. Hales (1988). "ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in pancreatic beta-cells. Spare-channel hypothesis." Diabetes **37**(5): 495-8.
72. Czempinski, K., S. Zimmermann, T. Ehrhardt and B. Muller-Rober (1997). "New structure and function in plant K<sup>+</sup> channels: KCO1, an outward rectifier with a steep Ca<sup>2+</sup> dependency." EMBO J **16**(10): 2565-75.
73. Czirjak, G. and P. Enyedi (2002). "Formation of functional heterodimers between the TASK-1 and TASK-3 two-pore domain potassium channel subunits." J Biol Chem **277**(7): 5426-32.
74. Czirjak, G. and P. Enyedi (2002). "TASK-3 dominates the background potassium conductance in rat adrenal glomerulosa cells." Mol Endocrinol **16**(3): 621-9.
75. Czirjak, G. and P. Enyedi (2003). "Ruthenium red inhibits TASK-3 potassium channel by interconnecting glutamate 70 of the two subunits." Mol Pharmacol **63**(3): 646-52.
76. Czirjak, G. and P. Enyedi (2006). "Targeting of calcineurin to an NFAT-like docking site is required for the calcium-dependent activation of the background K<sup>+</sup> channel, TRESK." J Biol Chem **281**(21): 14677-82.
77. Czirjak, G., Z. E. Toth and P. Enyedi (2004). "The two-pore domain K<sup>+</sup> channel, TRESK, is activated by the cytoplasmic calcium signal through calcineurin." J Biol Chem **279**(18): 18550-8.
78. Czirjak, G., D. Vuity and P. Enyedi (2008). "Phosphorylation-dependent binding of 14-3-3 proteins controls TRESK regulation." J Biol Chem **283**(23): 15672-80.
79. Dart, C. and M. L. Leyland (2001). "Targeting of an A kinase-anchoring protein, AKAP79, to an inwardly rectifying potassium channel, Kir2.1." J Biol Chem **276**(23): 20499-505.
80. Dascal, N., C. A. Doupnik, T. Ivanina, S. Bausch, W. Wang, C. Lin, J. Garvey, C. Chavkin, H. A. Lester and N. Davidson (1995). "Inhibition of function in *Xenopus* oocytes of the inwardly rectifying G-protein-activated atrial K channel (GIRK1) by overexpression of a membrane-attached form of the C-terminal tail." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(15): 6758-62.
81. Deal, K. K., S. K. England and M. M. Tamkun (1996). "Molecular physiology of cardiac potassium channels." Physiol Rev **76**(1): 49-67.
82. Debanne, D., N. C. Guerineau, B. H. Gahwiler and S. M. Thompson (1997). "Action-potential propagation gated by an axonal I(A)-like K<sup>+</sup> conductance in hippocampus." Nature **389**(6648): 286-9.
83. Decher, N., M. Maier, W. Dittrich, J. Gassenhuber, A. Bruggemann, A. E. Busch and K. Steinmeyer (2001). "Characterization of TASK-4, a novel member of the pH-sensitive, two-pore domain potassium channel family." FEBS Lett **492**(1-2): 84-9.
84. Decressac, S., M. Franco, S. Bendahhou, R. Warth, S. Knauer, J. Barhanin, M. Lazdunski and F. Lesage (2004). "ARF6-dependent interaction of the TWIK1 K<sup>+</sup> channel with EFA6, a GDP/GTP exchange factor for ARF6." EMBO Rep **5**(12): 1171-5.



85. Dehmelt, L. and S. Halpain (2005). "The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins." Genome Biol **6**(1): 204.
86. Deng, P. Y., S. K. Poudel, L. Rojanathammanee, J. E. Porter and S. Lei (2007). "Serotonin inhibits neuronal excitability by activating two-pore domain  $K^+$  channels in the entorhinal cortex." Mol Pharmacol **72**(1): 208-18.
87. Deng, P. Y., Z. Xiao, C. Yang, L. Rojanathammanee, L. Grisanti, J. Watt, J. D. Geiger, R. Liu, J. E. Porter and S. Lei (2009). "GABA(B) receptor activation inhibits neuronal excitability and spatial learning in the entorhinal cortex by activating TREK-2  $K^+$  channels." Neuron **63**(2): 230-43.
88. Doring, F., C. Derst, E. Wischmeyer, C. Karschin, R. Schneggenburger, J. Daut and A. Karschin (1998). "The epithelial inward rectifier channel Kir7.1 displays unusual  $K^+$  permeation properties." J Neurosci **18**(21): 8625-36.
89. Doyle, D. A., J. Morais Cabral, R. A. Pfuetzner, A. Kuo, J. M. Gulbis, S. L. Cohen, B. T. Chait and R. MacKinnon (1998). "The structure of the potassium channel: molecular basis of  $K^+$  conduction and selectivity." Science **280**(5360): 69-77.
90. Duprat, F., C. Girard, G. Jarretou and M. Lazdunski (2005). "Pancreatic two P domain  $K^+$  channels TALK-1 and TALK-2 are activated by nitric oxide and reactive oxygen species." J Physiol **562**(Pt 1): 235-44.
91. Duprat, F., I. Lauritzen, A. Patel and E. Honore (2007). "The TASK background  $K_2P$  channels: chemo- and nutrient sensors." Trends Neurosci **30**(11): 573-80.
92. Duprat, F., F. Lesage, M. Fink, R. Reyes, C. Heurteaux and M. Lazdunski (1997). "TASK, a human background  $K^+$  channel to sense external pH variations near physiological pH." EMBO J **16**(17): 5464-71.
93. Duprat, F., F. Lesage, E. Guillemare, M. Fink, J. P. Hugnot, J. Bigay, M. Lazdunski, G. Romey and J. Barhanin (1995). "Heterologous multimeric assembly is essential for  $K^+$  channel activity of neuronal and cardiac G-protein-activated inward rectifiers." Biochem Biophys Res Commun **212**(2): 657-63.
94. Duprat, F., F. Lesage, A. J. Patel, M. Fink, G. Romey and M. Lazdunski (2000). "The neuroprotective agent riluzole activates the two P domain  $K(+)$  channels TREK-1 and TRAAK." Mol Pharmacol **57**(5): 906-12.
95. Eldstrom, J., K. W. Doerksen, D. F. Steele and D. Fedida (2002). "N-terminal PDZ-binding domain in Kv1 potassium channels." FEBS Lett **531**(3): 529-37.
96. Enyedi, P. and G. Czirjak (2010). "Molecular background of leak  $K^+$  currents: two-pore domain potassium channels." Physiol Rev **90**(2): 559-605.
97. Escande, D. and I. Caverio (1992). " $K^+$  channel openers and 'natural' cardioprotection." Trends Pharmacol Sci **13**(7): 269-72.
98. Ettaiche, M., C. Heurteaux, N. Blondeau, M. Borsotto, N. Tinel and M. Lazdunski (2001). "ATP-sensitive potassium channels ( $K(ATP)$ ) in retina: a key role for delayed ischemic tolerance." Brain Res **890**(1): 118-29.
99. Fanger, C. M., S. Ghanshani, N. J. Logsdon, H. Rauer, K. Kalman, J. Zhou, K. Beckingham, K. G. Chandy, M. D. Cahalan and J. Aiyar (1999). "Calmodulin mediates calcium-dependent activation of the intermediate conductance  $KCa$  channel,  $IKCa1$ ." J Biol Chem **274**(9): 5746-54.
100. Feliciangeli, S., S. Bendahhou, G. Sandoz, P. Gounon, M. Reichold, R. Warth, M. Lazdunski, J. Barhanin and F. Lesage (2007). "Does sumoylation control  $K_2P1/TWIK1$  background  $K^+$  channels?" Cell **130**(3): 563-9.



101. Feliciangeli, S., M. P. Tardy, G. Sandoz, F. C. Chatelain, R. Warth, J. Barhanin, S. Bendahhou and F. Lesage (2010). "Potassium channel silencing by constitutive endocytosis and intracellular sequestration." *J Biol Chem* **285**(7): 4798-805.
102. Fink, M., F. Duprat, F. Lesage, R. Reyes, G. Romey, C. Heurteaux and M. Lazdunski (1996). "Cloning, functional expression and brain localization of a novel unconventional outward rectifier K<sup>+</sup> channel." *EMBO J* **15**(24): 6854-62.
103. Fink, M., F. Lesage, F. Duprat, C. Heurteaux, R. Reyes, M. Fosset and M. Lazdunski (1998). "A neuronal two P domain K<sup>+</sup> channel stimulated by arachidonic acid and polyunsaturated fatty acids." *EMBO J* **17**(12): 3297-308.
104. Gabriel, J. M., B. Erne, L. Bernasconi, C. Tosi, A. Probst, L. Landmann and A. J. Steck (1998). "Confocal microscopic localization of anti-myelin-associated glycoprotein autoantibodies in a patient with peripheral neuropathy initially lacking a detectable IgM gammopathy." *Acta Neuropathol* **95**(5): 540-6.
105. Gamblin, T. C., K. Nachmanoff, S. Halpain and R. C. Williams, Jr. (1996). "Recombinant microtubule-associated protein 2c reduces the dynamic instability of individual microtubules." *Biochemistry* **35**(38): 12576-86.
106. Girard, C., F. Duprat, C. Terrenoire, N. Tinel, M. Fosset, G. Romey, M. Lazdunski and F. Lesage (2001). "Genomic and functional characteristics of novel human pancreatic 2P domain K(+) channels." *Biochem Biophys Res Commun* **282**(1): 249-56.
107. Girard, C., N. Tinel, C. Terrenoire, G. Romey, M. Lazdunski and M. Borsotto (2002). "p11, an annexin II subunit, an auxiliary protein associated with the background K<sup>+</sup> channel, TASK-1." *EMBO J* **21**(17): 4439-48.
108. Gnatenco, C., J. Han, A. K. Snyder and D. Kim (2002). "Functional expression of TREK-2 K<sup>+</sup> channel in cultured rat brain astrocytes." *Brain Res* **931**(1): 56-67.
109. Gola, M. and G. Romey (1971). "[Anomalous responses to subthreshold currents of certain somatic membranes (giant neurons of *Helix pomatia*). Voltage clamp analysis]." *Pflugers Arch* **327**(2): 105-31.
110. Goldman, D. E. (1943). "Potential, Impedance, and Rectification in Membranes." *J Gen Physiol* **27**(1): 37-60.
111. Goldstein, L. S. and Z. Yang (2000). "Microtubule-based transport systems in neurons: the roles of kinesins and dyneins." *Annu Rev Neurosci* **23**: 39-71.
112. Goldstein, S. A., L. A. Price, D. N. Rosenthal and M. H. Pausch (1996). "ORK1, a potassium-selective leak channel with two pore domains cloned from *Drosophila melanogaster* by expression in *Saccharomyces cerevisiae*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(23): 13256-61.
113. Gomperts, S. N. (1996). "Clustering membrane proteins: It's all coming together with the PSD-95/SAP90 protein family." *Cell* **84**(5): 659-62.
114. Gong, J., J. Xu, M. Bezanilla, R. van Huizen, R. Derin and M. Li (1999). "Differential stimulation of PKC phosphorylation of potassium channels by ZIP1 and ZIP2." *Science* **285**(5433): 1565-9.
115. Gosset, P., G. A. Ghezala, B. Korn, M. L. Yaspo, A. Poutska, H. Lehrach, P. M. Sinet and N. Creau (1997). "A new inward rectifier potassium channel gene (KCNJ15) localized on chromosome 21 in the Down syndrome chromosome region 1 (DCR1)." *Genomics* **44**(2): 237-41.
116. Gray, A. T., B. B. Zhao, C. H. Kindler, B. D. Winegar, M. J. Mazurek, J. Xu, R. A. Chavez, J. R. Forsayeth and C. S. Yost (2000). "Volatile anesthetics activate the human tandem pore domain baseline K<sup>+</sup> channel KCNK5." *Anesthesiology* **92**(6): 1722-30.





117. Gribble, F. M. and F. Reimann (2003). "Sulphonylurea action revisited: the post-cloning era." *Diabetologia* **46**(7): 875-91.
118. Gu, C., Y. N. Jan and L. Y. Jan (2003). "A conserved domain in axonal targeting of Kv1 (Shaker) voltage-gated potassium channels." *Science* **301**(5633): 646-9.
119. Gu, C., W. Zhou, M. A. Puthenveedu, M. Xu, Y. N. Jan and L. Y. Jan (2006). "The microtubule plus-end tracking protein EB1 is required for Kv1 voltage-gated K<sup>+</sup> channel axonal targeting." *Neuron* **52**(5): 803-16.
120. Gu, W., G. Schlichter, J. R. Hirsch, H. Engels, C. Karschin, A. Karschin, C. Derst, O. K. Steinlein and J. Daut (2002). "Expression pattern and functional characteristics of two novel splice variants of the two-pore-domain potassium channel TREK-2." *J Physiol* **539**(Pt 3): 657-68.
121. Gulbis, J. M., S. Mann and R. MacKinnon (1999). "Structure of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel beta subunit." *Cell* **97**(7): 943-52.
122. Gulbis, J. M., M. Zhou, S. Mann and R. MacKinnon (2000). "Structure of the cytoplasmic beta subunit-T1 assembly of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels." *Science* **289**(5476): 123-7.
123. Ha, T. S., M. S. Heo and C. S. Park (2004). "Functional effects of auxiliary beta4-subunit on rat large-conductance Ca(2<sup>+</sup>)-activated K(+) channel." *Biophys J* **86**(5): 2871-82.
124. Han, J., J. Truell, C. Gnatenco and D. Kim (2002). "Characterization of four types of background potassium channels in rat cerebellar granule neurons." *J Physiol* **542**(Pt 2): 431-44.
125. Hayabuchi, Y., C. Dart and N. B. Standen (2001). "Evidence for involvement of A-kinase anchoring protein in activation of rat arterial K(ATP) channels by protein kinase A." *J Physiol* **536**(Pt 2): 421-7.
126. Heginbotham, L., Z. Lu, T. Abramson and R. MacKinnon (1994). "Mutations in the K<sup>+</sup> channel signature sequence." *Biophys J* **66**(4): 1061-7.
127. Hepler, J. R. (1999). "Emerging roles for RGS proteins in cell signalling." *Trends Pharmacol Sci* **20**(9): 376-82.
128. Hervieu, G. J., J. E. Cluderay, C. W. Gray, P. J. Green, J. L. Ranson, A. D. Randall and H. J. Meadows (2001). "Distribution and expression of TREK-1, a two-pore-domain potassium channel, in the adult rat CNS." *Neuroscience* **103**(4): 899-919.
129. Heurteaux, C., N. Guy, C. Laigle, N. Blondeau, F. Duprat, M. Mazzuca, L. Lang-Lazdunski, C. Widmann, M. Zanzouri, G. Romey and M. Lazdunski (2004). "TREK-1, a K<sup>+</sup> channel involved in neuroprotection and general anesthesia." *EMBO J* **23**(13): 2684-95.
130. Heurteaux, C., G. Lucas, N. Guy, M. El Yacoubi, S. Thummler, X. D. Peng, F. Noble, N. Blondeau, C. Widmann, M. Borsotto, G. Gobbi, J. M. Vaugeois, G. Debonnel and M. Lazdunski (2006). "Deletion of the background potassium channel TREK-1 results in a depression-resistant phenotype." *Nat Neurosci* **9**(9): 1134-41.
131. Hibino, H., A. Inanobe, K. Furutani, S. Murakami, I. Findlay and Y. Kurachi (2010). "Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles." *Physiol Rev* **90**(1): 291-366.
132. Hibino, H., A. Inanobe, M. Tanemoto, A. Fujita, K. Doi, T. Kubo, Y. Hata, Y. Takai and Y. Kurachi (2000). "Anchoring proteins confer G protein sensitivity to an inward-rectifier K(+) channel through the GK domain." *EMBO J* **19**(1): 78-83.
133. Ho, K., C. G. Nichols, W. J. Lederer, J. Lytton, P. M. Vassilev, M. V. Kanazirska and S. C. Hebert (1993). "Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel." *Nature* **362**(6415): 31-8.



134. Hodgkin, A. L. and A. F. Huxley (1952). "A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve." J Physiol **117**(4): 500-44.
135. Hodgkin, A. L. and B. Katz (1949). "The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid." J Physiol **108**(1): 37-77.
136. Hoekstra, D., D. Tyteca and I. S. C. van (2004). "The subapical compartment: a traffic center in membrane polarity development." J Cell Sci **117**(Pt 11): 2183-92.
137. Holmqvist, M. H., J. Cao, R. Hernandez-Pineda, M. D. Jacobson, K. I. Carroll, M. A. Sung, M. Betty, P. Ge, K. J. Gilbride, M. E. Brown, M. E. Jurman, D. Lawson, I. Silos-Santiago, Y. Xie, M. Covarrubias, K. J. Rhodes, P. S. Distefano and W. F. An (2002). "Elimination of fast inactivation in Kv4 A-type potassium channels by an auxiliary subunit domain." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(2): 1035-40.
138. Honore, E. (2007). "The neuronal background K2P channels: focus on TREK1." Nat Rev Neurosci **8**(4): 251-61.
139. Honore, E., F. Maingret, M. Lazdunski and A. J. Patel (2002). "An intracellular proton sensor commands lipid- and mechano-gating of the K(+) channel TREK-1." EMBO J **21**(12): 2968-76.
140. Honore, E., A. J. Patel, J. Chemin, T. Suchyna and F. Sachs (2006). "Desensitization of mechano-gated K2P channels." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(18): 6859-64.
141. Hoppe, U. C. (2010). "Mitochondrial calcium channels." FEBS Lett **584**(10): 1975-81.
142. Hoshi, N., H. Takahashi, M. Shahidullah, S. Yokoyama and H. Higashida (1998). "KCR1, a membrane protein that facilitates functional expression of non-inactivating K+ currents associates with rat EAG voltage-dependent K+ channels." J Biol Chem **273**(36): 23080-5.
143. Hoshi, T., W. N. Zagotta and R. W. Aldrich (1990). "Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation." Science **250**(4980): 533-8.
144. Hoshi, T., W. N. Zagotta and R. W. Aldrich (1991). "Two types of inactivation in Shaker K+ channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region." Neuron **7**(4): 547-56.
145. Hsueh, Y. P., E. Kim and M. Sheng (1997). "Disulfide-linked head-to-head multimerization in the mechanism of ion channel clustering by PSD-95." Neuron **18**(5): 803-14.
146. Hsueh, Y. P. and M. Sheng (1999). "Requirement of N-terminal cysteines of PSD-95 for PSD-95 multimerization and ternary complex formation, but not for binding to potassium channel Kv1.4." J Biol Chem **274**(1): 532-6.
147. Huang, C. L., P. A. Slesinger, P. J. Casey, Y. N. Jan and L. Y. Jan (1995). "Evidence that direct binding of G beta gamma to the GIRK1 G protein-gated inwardly rectifying K+ channel is important for channel activation." Neuron **15**(5): 1133-43.
148. Huang, D. Y., B. W. Yu and Q. W. Fan (2008). "Roles of TRESK, a novel two-pore domain K+ channel, in pain pathway and general anesthesia." Neurosci Bull **24**(3): 166-72.
149. Ibrahim, N., M. A. Bosch, J. L. Smart, J. Qiu, M. Rubinstein, O. K. Ronnekleiv, M. J. Low and M. J. Kelly (2003). "Hypothalamic proopiomelanocortin neurons are glucose responsive and express K(ATP) channels." Endocrinology **144**(4): 1331-40.
150. Inagaki, N., T. Gono, J. P. Clement, C. Z. Wang, L. Aguilar-Bryan, J. Bryan and S. Seino (1996). "A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K+ channels." Neuron **16**(5): 1011-7.
151. Inagaki, N., T. Gono and S. Seino (1997). "Subunit stoichiometry of the pancreatic beta-cell ATP-sensitive K+ channel." FEBS Lett **409**(2): 232-6.



152. Inagaki, N., Y. Tsuura, N. Namba, K. Masuda, T. Gonoj, M. Horie, Y. Seino, M. Mizuta and S. Seino (1995). "Cloning and functional characterization of a novel ATP-sensitive potassium channel ubiquitously expressed in rat tissues, including pancreatic islets, pituitary, skeletal muscle, and heart." J Biol Chem **270**(11): 5691-4.
153. Inanobe, A., A. Fujita, M. Ito, H. Tomoike, K. Inageda and Y. Kurachi (2002). "Inward rectifier K<sup>+</sup> channel Kir2.3 is localized at the postsynaptic membrane of excitatory synapses." Am J Physiol Cell Physiol **282**(6): C1396-403.
154. Inanobe, A., T. Matsuura, A. Nakagawa and Y. Kurachi (2007). "Structural diversity in the cytoplasmic region of G protein-gated inward rectifier K<sup>+</sup> channels." Channels (Austin) **1**(1): 39-45.
155. Inanobe, A., Y. Yoshimoto, Y. Horio, K. I. Morishige, H. Hibino, S. Matsumoto, Y. Tokunaga, T. Maeda, Y. Hata, Y. Takai and Y. Kurachi (1999). "Characterization of G-protein-gated K<sup>+</sup> channels composed of Kir3.2 subunits in dopaminergic neurons of the substantia nigra." J Neurosci **19**(3): 1006-17.
156. Isacoff, E. Y., Y. N. Jan and L. Y. Jan (1991). "Putative receptor for the cytoplasmic inactivation gate in the Shaker K<sup>+</sup> channel." Nature **353**(6339): 86-90.
157. Ishii, T. M., C. Silvia, B. Hirschberg, C. T. Bond, J. P. Adelman and J. Maylie (1997). "A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(21): 11651-6.
158. Jan, L. Y., S. Barbel, L. Timpe, C. Laffer, L. Salkoff, P. O'Farrell and Y. N. Jan (1983). "Mutating a gene for a potassium channel by hybrid dysgenesis: an approach to the cloning of the Shaker locus in *Drosophila*." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **48 Pt 1**: 233-45.
159. Jelacic, T. M., S. M. Sims and D. E. Clapham (1999). "Functional expression and characterization of G-protein-gated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels containing GIRK3." J Membr Biol **169**(2): 123-9.
160. Jerng, H. H., A. D. Lauver and P. J. Pfaffinger (2007). "DPP10 splice variants are localized in distinct neuronal populations and act to differentially regulate the inactivation properties of Kv4-based ion channels." Mol Cell Neurosci **35**(4): 604-24.
161. Jerng, H. H., P. J. Pfaffinger and M. Covarrubias (2004). "Molecular physiology and modulation of somatodendritic A-type potassium channels." Mol Cell Neurosci **27**(4): 343-69.
162. Ji, R. R. and C. J. Woolf (2001). "Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain." Neurobiol Dis **8**(1): 1-10.
163. Johnston, D., B. R. Christie, A. Frick, R. Gray, D. A. Hoffman, L. K. Schexnayder, S. Watanabe and L. L. Yuan (2003). "Active dendrites, potassium channels and synaptic plasticity." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **358**(1432): 667-74.
164. Kang, C., C. Tian, F. D. Sonnichsen, J. A. Smith, J. Meiler, A. L. George, Jr., C. G. Vanoye, H. J. Kim and C. R. Sanders (2008). "Structure of KCNE1 and implications for how it modulates the KCNQ1 potassium channel." Biochemistry **47**(31): 7999-8006.
165. Kang, D., C. Choe and D. Kim (2005). "Thermosensitivity of the two-pore domain K<sup>+</sup> channels TREK-2 and TRAAK." J Physiol **564**(Pt 1): 103-16.
166. Kang, D., J. Han, E. M. Talley, D. A. Bayliss and D. Kim (2004). "Functional expression of TASK-1/TASK-3 heteromers in cerebellar granule cells." J Physiol **554**(Pt 1): 64-77.



167. Kang, D. and D. Kim (2004). "Single-channel properties and pH sensitivity of two-pore domain K<sup>+</sup> channels of the TALK family." Biochem Biophys Res Commun **315**(4): 836-44.
168. Kang, D. and D. Kim (2006). "TREK-2 (K2P10.1) and TRESK (K2P18.1) are major background K<sup>+</sup> channels in dorsal root ganglion neurons." Am J Physiol Cell Physiol **291**(1): C138-46.
169. Kang, D., E. Mariash and D. Kim (2004). "Functional expression of TRESK-2, a new member of the tandem-pore K<sup>+</sup> channel family." J Biol Chem **279**(27): 28063-70.
170. Kaplan, W. D. and W. E. Trout, 3rd (1969). "The behavior of four neurological mutants of *Drosophila*." Genetics **61**(2): 399-409.
171. Kashina, A. S., I. V. Semenova, P. A. Ivanov, E. S. Potekhina, I. Zaliapin and V. I. Rodionov (2004). "Protein kinase A, which regulates intracellular transport, forms complexes with molecular motors on organelles." Curr Biol **14**(20): 1877-81.
172. Katz, B. (1949). "Les constantes électriques de la membrane du muscle." Arch. sc. physiol. **3**: 285.
173. Kennard, L. E., J. R. Chumbley, K. M. Ranatunga, S. J. Armstrong, E. L. Veale and A. Mathie (2005). "Inhibition of the human two-pore domain potassium channel, TREK-1, by fluoxetine and its metabolite norfluoxetine." Br J Pharmacol **144**(6): 821-9.
174. Kennedy, M. E., J. Nemec, S. Corey, K. Wickman and D. E. Clapham (1999). "GIRK4 confers appropriate processing and cell surface localization to G-protein-gated potassium channels." J Biol Chem **274**(4): 2571-82.
175. Keshavaprasad, B., C. Liu, J. D. Au, C. H. Kindler, J. F. Cotten and C. S. Yost (2005). "Species-specific differences in response to anesthetics and other modulators by the K2P channel TRESK." Anesth Analg **101**(4): 1042-9, table of contents.
176. Ketchum, K. A., W. J. Joiner, A. J. Sellers, L. K. Kaczmarek and S. A. Goldstein (1995). "A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem." Nature **376**(6542): 690-5.
177. Kim, D. (2003). "Fatty acid-sensitive two-pore domain K<sup>+</sup> channels." Trends Pharmacol Sci **24**(12): 648-54.
178. Kim, D. and C. Gnatenco (2001). "TASK-5, a new member of the tandem-pore K(+) channel family." Biochem Biophys Res Commun **284**(4): 923-30.
179. Kim, E., E. M. Hwang, O. Yarishkin, J. C. Yoo, D. Kim, N. Park, M. Cho, Y. S. Lee, C. H. Sun, G. S. Yi, J. Yoo, D. Kang, J. Han, S. G. Hong and J. Y. Park (2010). "Enhancement of TREK1 channel surface expression by protein-protein interaction with beta-COP." Biochem Biophys Res Commun **395**(2): 244-50.
180. Kim, E., M. Niethammer, A. Rothschild, Y. N. Jan and M. Sheng (1995). "Clustering of Shaker-type K<sup>+</sup> channels by interaction with a family of membrane-associated guanylate kinases." Nature **378**(6552): 85-8.
181. Kim, J. S., J. Y. Park, H. W. Kang, E. J. Lee, H. Bang and J. H. Lee (2005). "Zinc activates TREK-2 potassium channel activity." J Pharmacol Exp Ther **314**(2): 618-25.
182. Kim, Y., H. Bang and D. Kim (2000). "TASK-3, a new member of the tandem pore K(+) channel family." J Biol Chem **275**(13): 9340-7.
183. Kim, Y., C. Gnatenco, H. Bang and D. Kim (2001). "Localization of TREK-2 K<sup>+</sup> channel domains that regulate channel kinetics and sensitivity to pressure, fatty acids and pH." Pflugers Arch **442**(6): 952-60.





184. Kindler, C. H., M. Paul, H. Zou, C. Liu, B. D. Winegar, A. T. Gray and C. S. Yost (2003). "Amide local anesthetics potently inhibit the human tandem pore domain background K<sup>+</sup> channel TASK-2 (KCNK5)." *J Pharmacol Exp Ther* **306**(1): 84-92.
185. Klein, H., L. Garneau, M. Coady, G. Lemay, J. Y. Lapointe and R. Sauve (1999). "Molecular characterization of an inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel from HeLa cells." *J Membr Biol* **167**(1): 43-52.
186. Kofuji, P., N. Davidson and H. A. Lester (1995). "Evidence that neuronal G-protein-gated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels are activated by G beta gamma subunits and function as heteromultimers." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(14): 6542-6.
187. Komatsu, A., S. Singh, P. Rathe and C. F. Wu (1990). "Mutational and gene dosage analysis of calcium-activated potassium channels in Drosophila: correlation of micro- and macroscopic currents." *Neuron* **4**(2): 313-21.
188. Kramer, J. W., M. A. Post, A. M. Brown and G. E. Kirsch (1998). "Modulation of potassium channel gating by coexpression of Kv2.1 with regulatory Kv5.1 or Kv6.1 alpha-subunits." *Am J Physiol* **274**(6 Pt 1): C1501-10.
189. Krapivinsky, G., E. A. Gordon, K. Wickman, B. Velimirovic, L. Krapivinsky and D. E. Clapham (1995). "The G-protein-gated atrial K<sup>+</sup> channel IKACH is a heteromultimer of two inwardly rectifying K(+) channel proteins." *Nature* **374**(6518): 135-41.
190. Krapivinsky, G., L. Krapivinsky, K. Wickman and D. E. Clapham (1995). "G beta gamma binds directly to the G protein-gated K<sup>+</sup> channel, IKACH." *J Biol Chem* **270**(49): 29059-62.
191. Krapivinsky, G., I. Medina, L. Eng, L. Krapivinsky, Y. Yang and D. E. Clapham (1998). "A novel inward rectifier K<sup>+</sup> channel with unique pore properties." *Neuron* **20**(5): 995-1005.
192. Kubisch, C., B. C. Schroeder, T. Friedrich, B. Lütjohann, A. El-Amraoui, S. Marlin, C. Petit and T. J. Jentsch (1999). "KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness." *Cell* **96**(3): 437-46.
193. Kubo, Y., E. Reuveny, P. A. Slesinger, Y. N. Jan and L. Y. Jan (1993). "Primary structure and functional expression of a rat G-protein-coupled muscarinic potassium channel." *Nature* **364**(6440): 802-6.
194. Kunkel, M. T., D. B. Johnstone, J. H. Thomas and L. Salkoff (2000). "Mutants of a temperature-sensitive two-P domain potassium channel." *J Neurosci* **20**(20): 7517-24.
195. Kurokawa, J., H. K. Motoike, J. Rao and R. S. Kass (2004). "Regulatory actions of the A-kinase anchoring protein Yotiao on a heart potassium channel downstream of PKA phosphorylation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(46): 16374-8.
196. Laufer, J., C. Boehmer, S. Jeyaraj, M. Knuwer, F. Klaus, R. Lindner, M. Palmada and F. Lang (2009). "The C-terminal PDZ-binding motif in the Kv1.5 potassium channel governs its modulation by the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor 2." *Cell Physiol Biochem* **23**(1-3): 25-36.
197. Lauritzen, I., N. Blondeau, C. Heurteaux, C. Widmann, G. Romey and M. Lazdunski (2000). "Polyunsaturated fatty acids are potent neuroprotectors." *EMBO J* **19**(8): 1784-93.
198. Lauritzen, I., J. Chemin, E. Honore, M. Jodar, N. Guy, M. Lazdunski and A. Jane Patel (2005). "Cross-talk between the mechano-gated K2P channel TREK-1 and the actin cytoskeleton." *EMBO Rep* **6**(7): 642-8.



199. Lauritzen, I., M. Zanzouri, E. Honore, F. Duprat, M. U. Ehrenguber, M. Lazdunski and A. J. Patel (2003). "K<sup>+</sup>-dependent cerebellar granule neuron apoptosis. Role of task leak K<sup>+</sup> channels." *J Biol Chem* **278**(34): 32068-76.
200. Lazdunski, M., B. Allard, H. Bernardi, J. De Weille, M. Fosset, C. Heurteaux and E. Honore (1994). "ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels." *Ren Physiol Biochem* **17**(3-4): 118-20.
201. Le Maout, S., P. A. Welling, M. Brejon, O. Olsen and J. Merot (2001). "Basolateral membrane expression of a K<sup>+</sup> channel, Kir 2.3, is directed by a cytoplasmic COOH-terminal domain." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(18): 10475-80.
202. Lee, K., A. K. Dixon, P. J. Richardson and R. D. Pinnock (1999). "Glucose-receptive neurones in the rat ventromedial hypothalamus express KATP channels composed of Kir6.1 and SUR1 subunits." *J Physiol* **515** ( Pt 2): 439-52.
203. Leicher, T., J. Roeper, K. Weber, X. Wang and O. Pongs (1996). "Structural and functional characterization of human potassium channel subunit beta 1 (KCNA1B)." *Neuropharmacology* **35**(7): 787-95.
204. Leonoudakis, D., L. R. Conti, S. Anderson, C. M. Radeke, L. M. McGuire, M. E. Adams, S. C. Froehner, J. R. Yates, 3rd and C. A. Vandenberg (2004). "Protein trafficking and anchoring complexes revealed by proteomic analysis of inward rectifier potassium channel (Kir2.x)-associated proteins." *J Biol Chem* **279**(21): 22331-46.
205. Lesage, F., F. Duprat, M. Fink, E. Guillemare, T. Coppola, M. Lazdunski and J. P. Hugnot (1994). "Cloning provides evidence for a family of inward rectifier and G-protein coupled K<sup>+</sup> channels in the brain." *FEBS Lett* **353**(1): 37-42.
206. Lesage, F., E. Guillemare, M. Fink, F. Duprat, C. Heurteaux, M. Fosset, G. Romey, J. Barhanin and M. Lazdunski (1995). "Molecular properties of neuronal G-protein-activated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels." *J Biol Chem* **270**(48): 28660-7.
207. Lesage, F., E. Guillemare, M. Fink, F. Duprat, M. Lazdunski, G. Romey and J. Barhanin (1996). "A pH-sensitive yeast outward rectifier K<sup>+</sup> channel with two pore domains and novel gating properties." *J Biol Chem* **271**(8): 4183-7.
208. Lesage, F., E. Guillemare, M. Fink, F. Duprat, M. Lazdunski, G. Romey and J. Barhanin (1996). "TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K<sup>+</sup> channel with a novel structure." *EMBO J* **15**(5): 1004-11.
209. Lesage, F., I. Lauritzen, F. Duprat, R. Reyes, M. Fink, C. Heurteaux and M. Lazdunski (1997). "The structure, function and distribution of the mouse TWIK-1 K<sup>+</sup> channel." *FEBS Lett* **402**(1): 28-32.
210. Lesage, F. and M. Lazdunski (2000). "Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels." *Am J Physiol Renal Physiol* **279**(5): F793-801.
211. Lesage, F., F. Maingret and M. Lazdunski (2000). "Cloning and expression of human TRAAK, a polyunsaturated fatty acids-activated and mechano-sensitive K(+) channel." *FEBS Lett* **471**(2-3): 137-40.
212. Lesage, F., R. Reyes, M. Fink, F. Duprat, E. Guillemare and M. Lazdunski (1996). "Dimerization of TWIK-1 K<sup>+</sup> channel subunits via a disulfide bridge." *EMBO J* **15**(23): 6400-7.
213. Lesage, F., C. Terrenoire, G. Romey and M. Lazdunski (2000). "Human TREK2, a 2P domain mechano-sensitive K<sup>+</sup> channel with multiple regulations by polyunsaturated fatty acids, lysophospholipids, and Gs, Gi, and Gq protein-coupled receptors." *J Biol Chem* **275**(37): 28398-405.
214. Levitan, I. B. (2006). "Signaling protein complexes associated with neuronal ion channels." *Nat Neurosci* **9**(3): 305-10.



215. Lewis, A., Z. A. McCrossan and G. W. Abbott (2004). "MinK, MiRP1, and MiRP2 diversify Kv3.1 and Kv3.2 potassium channel gating." *J Biol Chem* **279**(9): 7884-92.
216. Liu, C., J. D. Au, H. L. Zou, J. F. Cotten and C. S. Yost (2004). "Potent activation of the human tandem pore domain K channel TRESK with clinical concentrations of volatile anesthetics." *Anesth Analg* **99**(6): 1715-22, table of contents.
217. Liu, J., K. Solway, R. O. Messing and F. R. Sharp (1998). "Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils." *J Neurosci* **18**(19): 7768-78.
218. Lopatin, A. N. and C. G. Nichols (2001). "Inward rectifiers in the heart: an update on I(K1)." *J Mol Cell Cardiol* **33**(4): 625-38.
219. Lopez-Barneo, J., T. Hoshi, S. H. Heinemann and R. W. Aldrich (1993). "Effects of external cations and mutations in the pore region on C-type inactivation of Shaker potassium channels." *Receptors Channels* **1**(1): 61-71.
220. Lourdel, S., M. Paulais, F. Cluzeaud, M. Bens, M. Tanemoto, Y. Kurachi, A. Vandewalle and J. Teulon (2002). "An inward rectifier K(+) channel at the basolateral membrane of the mouse distal convoluted tubule: similarities with Kir4-Kir5.1 heteromeric channels." *J Physiol* **538**(Pt 2): 391-404.
221. Lu, M., Q. Leng, M. E. Egan, M. J. Caplan, E. L. Boulpaep, G. H. Giebisch and S. C. Hebert (2006). "CFTR is required for PKA-regulated ATP sensitivity of Kir1.1 potassium channels in mouse kidney." *J Clin Invest* **116**(3): 797-807.
222. Lu, R., A. Alioua, Y. Kumar, M. Eghbali, E. Stefani and L. Toro (2006). "MaxiK channel partners: physiological impact." *J Physiol* **570**(Pt 1): 65-72.
223. Luscher, C. and P. A. Slesinger (2010). "Emerging roles for G protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channels in health and disease." *Nat Rev Neurosci* **11**(5): 301-15.
224. Ma, D., N. Zerangue, K. Raab-Graham, S. R. Fried, Y. N. Jan and L. Y. Jan (2002). "Diverse trafficking patterns due to multiple traffic motifs in G protein-activated inwardly rectifying potassium channels from brain and heart." *Neuron* **33**(5): 715-29.
225. MacKinnon, R., L. Heginbotham and T. Abramson (1990). "Mapping the receptor site for charybdotoxin, a pore-blocking potassium channel inhibitor." *Neuron* **5**(6): 767-71.
226. MacKinnon, R. and C. Miller (1989). "Mutant potassium channels with altered binding of charybdotoxin, a pore-blocking peptide inhibitor." *Science* **245**(4924): 1382-5.
227. Mackrill, J. J. (2010). "Ryanodine receptor calcium channels and their partners as drug targets." *Biochem Pharmacol* **79**(11): 1535-43.
228. Maffie, J., T. Blenkinsop and B. Rudy (2009). "A novel DPP6 isoform (DPP6-E) can account for differences between neuronal and reconstituted A-type K(+) channels." *Neurosci Lett* **449**(3): 189-94.
229. Maffie, J. and B. Rudy (2008). "Weighing the evidence for a ternary protein complex mediating A-type K+ currents in neurons." *J Physiol* **586**(Pt 23): 5609-23.
230. Maingret, F., M. Fosset, F. Lesage, M. Lazdunski and E. Honore (1999). "TRAAK is a mammalian neuronal mechano-gated K+ channel." *J Biol Chem* **274**(3): 1381-7.
231. Maingret, F., E. Honore, M. Lazdunski and A. J. Patel (2002). "Molecular basis of the voltage-dependent gating of TREK-1, a mechano-sensitive K(+) channel." *Biochem Biophys Res Commun* **292**(2): 339-46.
232. Maingret, F., I. Lauritzen, A. J. Patel, C. Heurteaux, R. Reyes, F. Lesage, M. Lazdunski and E. Honore (2000). "TREK-1 is a heat-activated background K(+) channel." *EMBO J* **19**(11): 2483-91.



233. Maingret, F., A. J. Patel, M. Lazdunski and E. Honore (2001). "The endocannabinoid anandamide is a direct and selective blocker of the background K(+) channel TASK-1." EMBO J **20**(1-2): 47-54.
234. Maingret, F., A. J. Patel, F. Lesage, M. Lazdunski and E. Honore (1999). "Mechano- or acid stimulation, two interactive modes of activation of the TREK-1 potassium channel." J Biol Chem **274**(38): 26691-6.
235. Maingret, F., A. J. Patel, F. Lesage, M. Lazdunski and E. Honore (2000). "Lysophospholipids open the two-pore domain mechano-gated K(+) channels TREK-1 and TRAAK." J Biol Chem **275**(14): 10128-33.
236. Marrion, N. V. (1997). "Control of M-current." Annu Rev Physiol **59**: 483-504.
237. Marx, S. O., J. Kurokawa, S. Reiken, H. Motoike, J. D'Armiento, A. R. Marks and R. S. Kass (2002). "Requirement of a macromolecular signaling complex for beta adrenergic receptor modulation of the KCNQ1-KCNE1 potassium channel." Science **295**(5554): 496-9.
238. Mazella, J., O. Petrault, G. Lucas, E. Deval, S. Beraud-Dufour, C. Gandin, M. El-Yacoubi, C. Widmann, A. Guyon, E. Chevet, S. Taouji, G. Conductier, A. Corinus, T. Coppola, G. Gobbi, J. L. Nahon, C. Heurteaux and M. Borsotto "Spadin, a sortilin-derived peptide, targeting rodent TREK-1 channels: a new concept in the antidepressant drug design." PLoS Biol **8**(4): e1000355.
239. Mazella, J., N. Zsuzsger, V. Navarro, J. Chabry, M. Kaghad, D. Caput, P. Ferrara, N. Vita, D. Gully, J. P. Maffrand and J. P. Vincent (1998). "The 100-kDa neurotensin receptor is gp95/sortilin, a non-G-protein-coupled receptor." J Biol Chem **273**(41): 26273-6.
240. McCrossan, Z. A. and G. W. Abbott (2004). "The Mink-related peptides." Neuropharmacology **47**(6): 787-821.
241. McDonald, T. V., Z. Yu, Z. Ming, E. Palma, M. B. Meyers, K. W. Wang, S. A. Goldstein and G. I. Fishman (1997). "A minK-HERG complex regulates the cardiac potassium current I(Kr)." Nature **388**(6639): 289-92.
242. Meadows, H. J., C. G. Chapman, D. M. Duckworth, R. E. Kelsell, P. R. Murdock, S. Nasir, G. Rennie and A. D. Randall (2001). "The neuroprotective agent sipatrigine (BW619C89) potently inhibits the human tandem pore-domain K(+) channels TREK-1 and TRAAK." Brain Res **892**(1): 94-101.
243. Medhurst, A. D., G. Rennie, C. G. Chapman, H. Meadows, M. D. Duckworth, R. E. Kelsell, Gloger, II and M. N. Pangalos (2001). "Distribution analysis of human two pore domain potassium channels in tissues of the central nervous system and periphery." Brain Res Mol Brain Res **86**(1-2): 101-14.
244. Mellman, I. and W. J. Nelson (2008). "Coordinated protein sorting, targeting and distribution in polarized cells." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(11): 833-45.
245. Mirshahi, T. and D. E. Logothetis (2004). "Molecular determinants responsible for differential cellular distribution of G protein-gated inwardly rectifying K+ channels." J Biol Chem **279**(12): 11890-7.
246. Mislis, S., D. W. Barnett, D. M. Pressel, K. D. Gillis, D. W. Scharp and L. C. Falke (1992). "Stimulus-secretion coupling in beta-cells of transplantable human islets of Langerhans. Evidence for a critical role for Ca<sup>2+</sup> entry." Diabetes **41**(6): 662-70.
247. Misonou, H., M. Menegola, L. Buchwalder, E. W. Park, A. Meredith, K. J. Rhodes, R. W. Aldrich and J. S. Trimmer (2006). "Immunolocalization of the Ca<sup>2+</sup>-activated K+ channel Slo1 in axons and nerve terminals of mammalian brain and cultured neurons." J Comp Neurol **496**(3): 289-302.





248. Morais-Cabral, J. H., Y. Zhou and R. MacKinnon (2001). "Energetic optimization of ion conduction rate by the K<sup>+</sup> selectivity filter." *Nature* **414**(6859): 37-42.
249. Moreau, C., A. L. Prost, R. Derand and M. Vivaudou (2005). "SUR, ABC proteins targeted by KATP channel openers." *J Mol Cell Cardiol* **38**(6): 951-63.
250. Morishige, K., N. Takahashi, A. Jahangir, M. Yamada, H. Koyama, J. S. Zanelli and Y. Kurachi (1994). "Molecular cloning and functional expression of a novel brain-specific inward rectifier potassium channel." *FEBS Lett* **346**(2-3): 251-6.
251. Morishige, K. I., A. Inanobe, N. Takahashi, Y. Yoshimoto, H. Kurachi, A. Miyake, Y. Tokunaga, T. Maeda and Y. Kurachi (1996). "G protein-gated K<sup>+</sup> channel (GIRK1) protein is expressed presynaptically in the paraventricular nucleus of the hypothalamus." *Biochem Biophys Res Commun* **220**(2): 300-5.
252. Muller, S., C. Hoege, G. Pyrowolakis and S. Jentsch (2001). "SUMO, ubiquitin's mysterious cousin." *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(3): 202-10.
253. Murbartian, J., Q. Lei, J. J. Sando and D. A. Bayliss (2005). "Sequential phosphorylation mediates receptor- and kinase-induced inhibition of TREK-1 background potassium channels." *J Biol Chem* **280**(34): 30175-84.
254. Murphy, G. G., N. B. Fedorov, K. P. Giese, M. Ohno, E. Friedman, R. Chen and A. J. Silva (2004). "Increased neuronal excitability, synaptic plasticity, and learning in aged Kvbeta1.1 knockout mice." *Curr Biol* **14**(21): 1907-15.
255. Na, Y. J., J. K. Jin, Y. J. Lee, E. K. Choi, R. I. Carp and Y. S. Kim (2009). "Increased neurogenesis in brains of scrapie-infected mice." *Neurosci Lett* **449**(1): 66-70.
256. Nadal, M. S., A. Ozaita, Y. Amarillo, E. Vega-Saenz de Miera, Y. Ma, W. Mo, E. M. Goldberg, Y. Misumi, Y. Ikehara, T. A. Neubert and B. Rudy (2003). "The CD26-related dipeptidyl aminopeptidase-like protein DPPX is a critical component of neuronal A-type K<sup>+</sup> channels." *Neuron* **37**(3): 449-61.
257. Nayak, T. K., S. Harinath, S. Nama, K. Somasundaram and S. K. Sikdar (2009). "Inhibition of human two-pore domain K<sup>+</sup> channel TREK1 by local anesthetic lidocaine: negative cooperativity and half-of-sites saturation kinetics." *Mol Pharmacol* **76**(4): 903-17.
258. Need, A. C., E. E. Irvine and K. P. Giese (2003). "Learning and memory impairments in Kv beta 1.1-null mutants are rescued by environmental enrichment or ageing." *Eur J Neurosci* **18**(6): 1640-4.
259. Neher, E. and B. Sakmann (1976). "Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres." *Nature* **260**(5554): 799-802.
260. Nernst, W. (1889). "Die elektromotorische Wirksamkeit der Ionen." *Z phys Chem* **4**: 129-181.
261. Nichols, C. G. (2006). "KATP channels as molecular sensors of cellular metabolism." *Nature* **440**(7083): 470-6.
262. Nichols, C. G. and A. N. Lopatin (1997). "Inward rectifier potassium channels." *Annu Rev Physiol* **59**: 171-91.
263. Nicolas, M. T., J. Barhanin, R. Reyes and D. Dememes (2003). "Cellular localization of TWIK-1, a two-pore-domain potassium channel in the rodent inner ear." *Hear Res* **181**(1-2): 20-6.
264. Nie, X., I. Arrighi, B. Kaissling, I. Pfaff, J. Mann, J. Barhanin and V. Vallon (2005). "Expression and insights on function of potassium channel TWIK-1 in mouse kidney." *Pflugers Arch* **451**(3): 479-88.



265. Niemeyer, M. I., L. P. Cid and F. V. Sepulveda (2001). "K<sup>+</sup> conductance activated during regulatory volume decrease. The channels in Ehrlich cells and their possible molecular counterpart." Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol **130**(3): 565-75.
266. Noel, J., K. Zimmermann, J. Busserolles, E. Deval, A. Alloui, S. Diochot, N. Guy, M. Borsotto, P. Reeh, A. Eschalier and M. Lazdunski (2009). "The mechano-activated K<sup>+</sup> channels TRAAK and TREK-1 control both warm and cold perception." EMBO J **28**(9): 1308-18.
267. Noma, A. (1983). "ATP-regulated K<sup>+</sup> channels in cardiac muscle." Nature **305**(5930): 147-8.
268. Noma, A. and W. Trautwein (1978). "Relaxation of the ACh-induced potassium current in the rabbit sinoatrial node cell." Pflugers Arch **377**(3): 193-200.
269. Numa, S. (1987). "A molecular view of neurotransmitter receptors and ionic channels." Harvey Lect **83**: 121-65.
270. O'Kelly, I., M. H. Butler, N. Zilberberg and S. A. Goldstein (2002). "Forward transport. 14-3-3 binding overcomes retention in endoplasmic reticulum by dibasic signals." Cell **111**(4): 577-88.
271. O'Kelly, I. and S. A. Goldstein (2008). "Forward Transport of K2p3.1: mediation by 14-3-3 and COPI, modulation by p11." Traffic **9**(1): 72-8.
272. Obar, R. A., J. Dingus, H. Bayley and R. B. Vallee (1989). "The RII subunit of cAMP-dependent protein kinase binds to a common amino-terminal domain in microtubule-associated proteins 2A, 2B, and 2C." Neuron **3**(5): 639-45.
273. Olsen, O., H. Liu, J. B. Wade, J. Merot and P. A. Welling (2002). "Basolateral membrane expression of the Kir 2.3 channel is coordinated by PDZ interaction with Lin-7/CASK complex." Am J Physiol Cell Physiol **282**(1): C183-95.
274. Orio, P., P. Rojas, G. Ferreira and R. Latorre (2002). "New disguises for an old channel: MaxiK channel beta-subunits." News Physiol Sci **17**: 156-61.
275. Ottschytch, N., A. Raes, D. Van Hoorick and D. J. Snyders (2002). "Obligatory heterotetramerization of three previously uncharacterized Kv channel alpha-subunits identified in the human genome." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(12): 7986-91.
276. Ozer, R. S. and S. Halpain (2000). "Phosphorylation-dependent localization of microtubule-associated protein MAP2c to the actin cytoskeleton." Mol Biol Cell **11**(10): 3573-87.
277. Patel, A. J., E. Honore, F. Lesage, M. Fink, G. Romey and M. Lazdunski (1999). "Inhalational anesthetics activate two-pore-domain background K<sup>+</sup> channels." Nat Neurosci **2**(5): 422-6.
278. Patel, A. J., E. Honore, F. Maingret, F. Lesage, M. Fink, F. Duprat and M. Lazdunski (1998). "A mammalian two pore domain mechano-gated S-like K<sup>+</sup> channel." EMBO J **17**(15): 4283-90.
279. Patel, A. J., M. Lazdunski and E. Honore (1997). "Kv2.1/Kv9.3, a novel ATP-dependent delayed-rectifier K<sup>+</sup> channel in oxygen-sensitive pulmonary artery myocytes." EMBO J **16**(22): 6615-25.
280. Patel, A. J., M. Lazdunski and E. Honore (2001). "Lipid and mechano-gated 2P domain K(+) channels." Curr Opin Cell Biol **13**(4): 422-8.
281. Patel, A. J., F. Maingret, V. Magnone, M. Fosset, M. Lazdunski and E. Honore (2000). "TWIK-2, an inactivating 2P domain K<sup>+</sup> channel." J Biol Chem **275**(37): 28722-30.



282. Pell, T. J., G. F. Baxter, D. M. Yellon and G. M. Drew (1998). "Renal ischemia preconditions myocardium: role of adenosine receptors and ATP-sensitive potassium channels." Am J Physiol **275**(5 Pt 2): H1542-7.
283. Perez-Garcia, M. T., J. R. Lopez-Lopez and C. Gonzalez (1999). "Kvbeta1.2 subunit coexpression in HEK293 cells confers O<sub>2</sub> sensitivity to kv4.2 but not to Shaker channels." J Gen Physiol **113**(6): 897-907.
284. Perlis, R. H., P. Moorjani, J. Fagerness, S. Purcell, M. H. Trivedi, M. Fava, A. J. Rush and J. W. Smoller (2008). "Pharmacogenetic analysis of genes implicated in rodent models of antidepressant response: association of TREK1 and treatment resistance in the STAR(\*)D study." Neuropsychopharmacology **33**(12): 2810-9.
285. Pessia, M., S. J. Tucker, K. Lee, C. T. Bond and J. P. Adelman (1996). "Subunit positional effects revealed by novel heteromeric inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels." EMBO J **15**(12): 2980-7.
286. Petersen, O. H. (1992). "Stimulus-secretion coupling: cytoplasmic calcium signals and the control of ion channels in exocrine acinar cells." J Physiol **448**: 1-51.
287. Petkov, G. V., A. D. Bonev, T. J. Heppner, R. Brenner, R. W. Aldrich and M. T. Nelson (2001). "Beta1-subunit of the Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel regulates contractile activity of mouse urinary bladder smooth muscle." J Physiol **537**(Pt 2): 443-52.
288. Philpot, B. D., J. H. Lim and P. C. Brunjes (1997). "Activity-dependent regulation of calcium-binding proteins in the developing rat olfactory bulb." J Comp Neurol **387**(1): 12-26.
289. Plant, L. D., I. S. Dementieva, A. Kollewe, S. Olikara, J. D. Marks and S. A. Goldstein (2010). "One SUMO is sufficient to silence the dimeric potassium channel K2P1." Proc Natl Acad Sci U S A.
290. Pongs, O. and J. R. Schwarz (2010). "Ancillary subunits associated with voltage-dependent K<sup>+</sup> channels." Physiol Rev **90**(2): 755-96.
291. Ponting, C. P. (1997). "Evidence for PDZ domains in bacteria, yeast, and plants." Protein Sci **6**(2): 464-8.
292. Pourrier, M., G. Schram and S. Nattel (2003). "Properties, expression and potential roles of cardiac K<sup>+</sup> channel accessory subunits: MinK, MiRPs, KChIP, and KChAP." J Membr Biol **194**(3): 141-52.
293. Proks, P. and F. M. Ashcroft (2009). "Modeling K(ATP) channel gating and its regulation." Prog Biophys Mol Biol **99**(1): 7-19.
294. Pusch, M. (1998). "Increase of the single-channel conductance of KvLQT1 potassium channels induced by the association with minK." Pflugers Arch **437**(1): 172-4.
295. Rajan, S., L. D. Plant, M. L. Rabin, M. H. Butler and S. A. Goldstein (2005). "Sumoylation silences the plasma membrane leak K<sup>+</sup> channel K2P1." Cell **121**(1): 37-47.
296. Rajan, S., R. Preisig-Muller, E. Wischmeyer, R. Nehring, P. J. Hanley, V. Renigunta, B. Musset, G. Schlichthorl, C. Derst, A. Karschin and J. Daut (2002). "Interaction with 14-3-3 proteins promotes functional expression of the potassium channels TASK-1 and TASK-3." J Physiol **545**(Pt 1): 13-26.
297. Rajan, S., E. Wischmeyer, C. Karschin, R. Preisig-Muller, K. H. Grzeschik, J. Daut, A. Karschin and C. Derst (2001). "THIK-1 and THIK-2, a novel subfamily of tandem pore domain K<sup>+</sup> channels." J Biol Chem **276**(10): 7302-11.
298. Reid, G. and M. Flonta (2001). "Cold transduction by inhibition of a background potassium conductance in rat primary sensory neurones." Neurosci Lett **297**(3): 171-4.



299. Reissner, K. J., H. D. Boyle, X. Ye and T. J. Carew (2008). "Aplysia synapse associated protein (APSAP): identification, characterization, and selective interactions with Shaker-type potassium channels." *J Neurochem* **105**(3): 1006-18.
300. Ren, X., Y. Hayashi, N. Yoshimura and K. Takimoto (2005). "Transmembrane interaction mediates complex formation between peptidase homologues and Kv4 channels." *Mol Cell Neurosci* **29**(2): 320-32.
301. Renigunta, V., H. Yuan, M. Zuzarte, S. Rinne, A. Koch, E. Wischmeyer, G. Schlichthorl, Y. Gao, A. Karschin, R. Jacob, B. Schwappach, J. Daut and R. Preisig-Muller (2006). "The retention factor p11 confers an endoplasmic reticulum-localization signal to the potassium channel TASK-1." *Traffic* **7**(2): 168-81.
302. Rescher, U. and V. Gerke (2008). "S100A10/p11: family, friends and functions." *Pflugers Arch* **455**(4): 575-82.
303. Reyes, R., F. Duprat, F. Lesage, M. Fink, M. Salinas, N. Farman and M. Lazdunski (1998). "Cloning and expression of a novel pH-sensitive two pore domain K<sup>+</sup> channel from human kidney." *J Biol Chem* **273**(47): 30863-9.
304. Richardson, F. C. and L. K. Kaczmarek (2000). "Modification of delayed rectifier potassium currents by the Kv9.1 potassium channel subunit." *Hear Res* **147**(1-2): 21-30.
305. Riven, I., S. Iwanir and E. Reuveny (2006). "GIRK channel activation involves a local rearrangement of a preformed G protein channel complex." *Neuron* **51**(5): 561-73.
306. Roepke, T. K., A. Anantharam, P. Kirchhoff, S. M. Busque, J. B. Young, J. P. Geibel, D. J. Lerner and G. W. Abbott (2006). "The KCNE2 potassium channel ancillary subunit is essential for gastric acid secretion." *J Biol Chem* **281**(33): 23740-7.
307. Roepke, T. K., E. C. King, A. Reyna-Neyra, M. Paroder, K. Purtell, W. Koba, E. Fine, D. J. Lerner, N. Carrasco and G. W. Abbott (2009). "Kcne2 deletion uncovers its crucial role in thyroid hormone biosynthesis." *Nat Med* **15**(10): 1186-94.
308. Romey, G. and M. Lazdunski (1984). "The coexistence in rat muscle cells of two distinct classes of Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels with different pharmacological properties and different physiological functions." *Biochem Biophys Res Commun* **118**(2): 669-74.
309. Roux, B. and R. MacKinnon (1999). "The cavity and pore helices in the KcsA K<sup>+</sup> channel: electrostatic stabilization of monovalent cations." *Science* **285**(5424): 100-2.
310. Ruiz-Canada, C., Y. H. Koh, V. Budnik and F. J. Tejedor (2002). "DLG differentially localizes Shaker K<sup>+</sup>-channels in the central nervous system and retina of Drosophila." *J Neurochem* **82**(6): 1490-501.
311. Sadjia, R., N. Alagem and E. Reuveny (2003). "Gating of GIRK channels: details of an intricate, membrane-delimited signaling complex." *Neuron* **39**(1): 9-12.
312. Sah, P. (1996). "Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> currents in neurones: types, physiological roles and modulation." *Trends Neurosci* **19**(4): 150-4.
313. Sah, P. and E. S. Faber (2002). "Channels underlying neuronal calcium-activated potassium currents." *Prog Neurobiol* **66**(5): 345-53.
314. Salazar-Colocho, P., J. L. Lanciego, J. Del Rio and D. Frechilla (2008). "Ischemia induces cell proliferation and neurogenesis in the gerbil hippocampus in response to neuronal death." *Neurosci Res* **61**(1): 27-37.
315. Salinas, M., J. de Weille, E. Guillemare, M. Lazdunski and J. P. Hugnot (1997). "Modes of regulation of shab K<sup>+</sup> channel activity by the Kv8.1 subunit." *J Biol Chem* **272**(13): 8774-80.





316. Salinas, M., F. Duprat, C. Heurteaux, J. P. Hugnot and M. Lazdunski (1997). "New modulatory alpha subunits for mammalian Shab K<sup>+</sup> channels." *J Biol Chem* **272**(39): 24371-9.
317. Salinas, M., R. Reyes, F. Lesage, M. Fosset, C. Heurteaux, G. Romey and M. Lazdunski (1999). "Cloning of a new mouse two-P domain channel subunit and a human homologue with a unique pore structure." *J Biol Chem* **274**(17): 11751-60.
318. Sandoz, G., D. Douguet, F. Chatelain, M. Lazdunski and F. Lesage (2009). "Extracellular acidification exerts opposite actions on TREK1 and TREK2 potassium channels via a single conserved histidine residue." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(34): 14628-33.
319. Sandoz, G., S. Thummler, F. Duprat, S. Feliciangeli, J. Vinh, P. Escoubas, N. Guy, M. Lazdunski and F. Lesage (2006). "AKAP150, a switch to convert mechano-, pH- and arachidonic acid-sensitive TREK K(+) channels into open leak channels." *EMBO J* **25**(24): 5864-72.
320. Sanguinetti, M. C., M. E. Curran, A. Zou, J. Shen, P. S. Spector, D. L. Atkinson and M. T. Keating (1996). "Coassembly of K(V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I(Ks) potassium channel." *Nature* **384**(6604): 80-3.
321. Sanguinetti, M. C., C. Jiang, M. E. Curran and M. T. Keating (1995). "A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the IKr potassium channel." *Cell* **81**(2): 299-307.
322. Sano, Y., K. Inamura, A. Miyake, S. Mochizuki, C. Kitada, H. Yokoi, K. Nozawa, H. Okada, H. Matsushime and K. Furuichi (2003). "A novel two-pore domain K<sup>+</sup> channel, TRESK, is localized in the spinal cord." *J Biol Chem* **278**(30): 27406-12.
323. Schmidt, D. and R. MacKinnon (2008). "Voltage-dependent K<sup>+</sup> channel gating and voltage sensor toxin sensitivity depend on the mechanical state of the lipid membrane." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(49): 19276-81.
324. Schoots, O., J. M. Wilson, N. Ethier, E. Bigras, T. E. Hebert and H. H. Van Tol (1999). "Co-expression of human Kir3 subunits can yield channels with different functional properties." *Cell Signal* **11**(12): 871-83.
325. Schroeder, B. C., S. Waldegger, S. Fehr, M. Bleich, R. Warth, R. Greger and T. J. Jentsch (2000). "A constitutively open potassium channel formed by KCNQ1 and KCNE3." *Nature* **403**(6766): 196-9.
326. Schulte, U., J. O. Thumfart, N. Klocker, C. A. Sailer, W. Bildl, M. Biniössek, D. Dehn, T. Deller, S. Eble, K. Abbass, T. Wangler, H. G. Knaus and B. Fakler (2006). "The epilepsy-linked Lgi1 protein assembles into presynaptic Kv1 channels and inhibits inactivation by Kvbeta1." *Neuron* **49**(5): 697-706.
327. Schultz, D., M. Litt, L. Smith, M. Thayer and K. McCormack (1996). "Localization of two potassium channel beta subunit genes, KCNA1B and KCNA2B." *Genomics* **31**(3): 389-91.
328. Schultz, J., R. R. Copley, T. Doerks, C. P. Ponting and P. Bork (2000). "SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains." *Nucleic Acids Res* **28**(1): 231-4.
329. Schumacher, M. A., A. F. Rivard, H. P. Bachinger and J. P. Adelman (2001). "Structure of the gating domain of a Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel complexed with Ca<sup>2+</sup>/calmodulin." *Nature* **410**(6832): 1120-4.
330. Seino, S. (1999). "ATP-sensitive potassium channels: a model of heteromultimeric potassium channel/receptor assemblies." *Annu Rev Physiol* **61**: 337-62.



331. Selyanko, A. A., P. Delmas, J. K. Hadley, L. Tatulian, I. C. Wood, M. Mistry, B. London and D. A. Brown (2002). "Dominant-negative subunits reveal potassium channel families that contribute to M-like potassium currents." *J Neurosci* **22**(5): RC212.
332. Sewing, S., J. Roeper and O. Pongs (1996). "Kv beta 1 subunit binding specific for shaker-related potassium channel alpha subunits." *Neuron* **16**(2): 455-63.
333. Shi, G., K. Nakahira, S. Hammond, K. J. Rhodes, L. E. Schechter and J. S. Trimmer (1996). "Beta subunits promote K<sup>+</sup> channel surface expression through effects early in biosynthesis." *Neuron* **16**(4): 843-52.
334. Shibata, R., H. Misonou, C. R. Campomanes, A. E. Anderson, L. A. Schrader, L. C. Doliveira, K. I. Carroll, J. D. Sweatt, K. J. Rhodes and J. S. Trimmer (2003). "A fundamental role for KChIPs in determining the molecular properties and trafficking of Kv4.2 potassium channels." *J Biol Chem* **278**(38): 36445-54.
335. Shuck, M. E., T. M. Piser, J. H. Bock, J. L. Slightom, K. S. Lee and M. J. Bienkowski (1997). "Cloning and characterization of two K<sup>+</sup> inward rectifier (Kir) 1.1 potassium channel homologs from human kidney (Kir1.2 and Kir1.3)." *J Biol Chem* **272**(1): 586-93.
336. Songyang, Z., A. S. Fanning, C. Fu, J. Xu, S. M. Marfatia, A. H. Chishti, A. Crompton, A. C. Chan, J. M. Anderson and L. C. Cantley (1997). "Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains." *Science* **275**(5296): 73-7.
337. Spruce, A. E., N. B. Standen and P. R. Stanfield (1985). "Voltage-dependent ATP-sensitive potassium channels of skeletal muscle membrane." *Nature* **316**(6030): 736-8.
338. Strop, P., A. J. Bankovich, K. C. Hansen, K. C. Garcia and A. T. Brunger (2004). "Structure of a human A-type potassium channel interacting protein DPPX, a member of the dipeptidyl aminopeptidase family." *J Mol Biol* **343**(4): 1055-65.
339. Takumi, T., T. Ishii, Y. Horio, K. Morishige, N. Takahashi, M. Yamada, T. Yamashita, H. Kiyama, K. Sohmiya, S. Nakanishi and et al. (1995). "A novel ATP-dependent inward rectifier potassium channel expressed predominantly in glial cells." *J Biol Chem* **270**(27): 16339-46.
340. Takumi, T., H. Ohkubo and S. Nakanishi (1988). "Cloning of a membrane protein that induces a slow voltage-gated potassium current." *Science* **242**(4881): 1042-5.
341. Talley, E. M., G. Solorzano, Q. Lei, D. Kim and D. A. Bayliss (2001). "Cns distribution of members of the two-pore-domain (KCNK) potassium channel family." *J Neurosci* **21**(19): 7491-505.
342. Tanemoto, M., A. Fujita, K. Higashi and Y. Kurachi (2002). "PSD-95 mediates formation of a functional homomeric Kir5.1 channel in the brain." *Neuron* **34**(3): 387-97.
343. Tanemoto, M., N. Kittaka, A. Inanobe and Y. Kurachi (2000). "In vivo formation of a proton-sensitive K<sup>+</sup> channel by heteromeric subunit assembly of Kir5.1 with Kir4.1." *J Physiol* **525 Pt 3**: 587-92.
344. Tanemoto, M., T. Toyohara, T. Abe and S. Ito (2008). "MAGI-1a functions as a scaffolding protein for the distal renal tubular basolateral K<sup>+</sup> channels." *J Biol Chem* **283**(18): 12241-7.
345. Theilig, F., I. Goranova, J. R. Hirsch, M. Wieske, S. Unsal, S. Bachmann, R. W. Veh and C. Derst (2008). "Cellular localization of THIK-1 (K(2P)13.1) and THIK-2 (K(2P)12.1) K channels in the mammalian kidney." *Cell Physiol Biochem* **21**(1-3): 63-74.
346. Thomas, D., L. D. Plant, C. M. Wilkens, Z. A. McCrossan and S. A. Goldstein (2008). "Alternative translation initiation in rat brain yields K2P2.1 potassium channels permeable to sodium." *Neuron* **58**(6): 859-70.



347. Tiffany, A. M., L. N. Manganas, E. Kim, Y. P. Hsueh, M. Sheng and J. S. Trimmer (2000). "PSD-95 and SAP97 exhibit distinct mechanisms for regulating K(+) channel surface expression and clustering." *J Cell Biol* **148**(1): 147-58.
348. Tilstra, J., K. K. Rehman, T. Hennon, S. E. Plevy, P. Clemens and P. D. Robbins (2007). "Protein transduction: identification, characterization and optimization." *Biochem Soc Trans* **35**(Pt 4): 811-5.
349. Tipparaju, S. M., O. A. Barski, S. Srivastava and A. Bhatnagar (2008). "Catalytic mechanism and substrate specificity of the beta-subunit of the voltage-gated potassium channel." *Biochemistry* **47**(34): 8840-54.
350. Tipparaju, S. M., N. Saxena, S. Q. Liu, R. Kumar and A. Bhatnagar (2005). "Differential regulation of voltage-gated K<sup>+</sup> channels by oxidized and reduced pyridine nucleotide coenzymes." *Am J Physiol Cell Physiol* **288**(2): C366-76.
351. Titus, S. A., J. W. Warmke and B. Ganetzky (1997). "The Drosophila erg K<sup>+</sup> channel polypeptide is encoded by the seizure locus." *J Neurosci* **17**(3): 875-81.
352. Toro, L., M. Wallner, P. Meera and Y. Tanaka (1998). "Maxi-K(Ca), a Unique Member of the Voltage-Gated K Channel Superfamily." *News Physiol Sci* **13**: 112-117.
353. Torres, Y. P., F. J. Morera, I. Carvacho and R. Latorre (2007). "A marriage of convenience: beta-subunits and voltage-dependent K<sup>+</sup> channels." *J Biol Chem* **282**(34): 24485-9.
354. Trudeau, M. C., J. W. Warmke, B. Ganetzky and G. A. Robertson (1995). "HERG, a human inward rectifier in the voltage-gated potassium channel family." *Science* **269**(5220): 92-5.
355. Tucker, S. J., F. M. Gribble, C. Zhao, S. Trapp and F. M. Ashcroft (1997). "Truncation of Kir6.2 produces ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in the absence of the sulphonylurea receptor." *Nature* **387**(6629): 179-83.
356. Tucker, S. J., P. Imbrici, L. Salvatore, M. C. D'Adamo and M. Pessia (2000). "pH dependence of the inwardly rectifying potassium channel, Kir5.1, and localization in renal tubular epithelia." *J Biol Chem* **275**(22): 16404-7.
357. Tzivion, G., Y. H. Shen and J. Zhu (2001). "14-3-3 proteins; bringing new definitions to scaffolding." *Oncogene* **20**(44): 6331-8.
358. Vadivelu, N. and R. Sinatra (2005). "Recent advances in elucidating pain mechanisms." *Curr Opin Anaesthesiol* **18**(5): 540-7.
359. Vergara, C., R. Latorre, N. V. Marrion and J. P. Adelman (1998). "Calcium-activated potassium channels." *Curr Opin Neurobiol* **8**(3): 321-9.
360. Vetter, D. E., J. R. Mann, P. Wangemann, J. Liu, K. J. McLaughlin, F. Lesage, D. C. Marcus, M. Lazdunski, S. F. Heinemann and J. Barhanin (1996). "Inner ear defects induced by null mutation of the isk gene." *Neuron* **17**(6): 1251-64.
361. Vivaudou, M., K. W. Chan, J. L. Sui, L. Y. Jan, E. Reuveny and D. E. Logothetis (1997). "Probing the G-protein regulation of GIRK1 and GIRK4, the two subunits of the KACH channel, using functional homomeric mutants." *J Biol Chem* **272**(50): 31553-60.
362. Wang, H. S., B. S. Brown, D. McKinnon and I. S. Cohen (2000). "Molecular basis for differential sensitivity of KCNQ and I(Ks) channels to the cognitive enhancer XE991." *Mol Pharmacol* **57**(6): 1218-23.
363. Wang, H. S., Z. Pan, W. Shi, B. S. Brown, R. S. Wymore, I. S. Cohen, J. E. Dixon and D. McKinnon (1998). "KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: molecular correlates of the M-channel." *Science* **282**(5395): 1890-3.



364. Wang, Q., M. E. Curran, I. Splawski, T. C. Burn, J. M. Millholland, T. J. VanRaay, J. Shen, K. W. Timothy, G. M. Vincent, T. de Jager, P. J. Schwartz, J. A. Toubin, A. J. Moss, D. L. Atkinson, G. M. Landes, T. D. Connors and M. T. Keating (1996). "Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias." Nat Genet **12**(1): 17-23.
365. Wang, Y. W., J. P. Ding, X. M. Xia and C. J. Lingle (2002). "Consequences of the stoichiometry of Slo1 alpha and auxiliary beta subunits on functional properties of large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels." J Neurosci **22**(5): 1550-61.
366. Warmke, J. W. and B. Ganetzky (1994). "A family of potassium channel genes related to eag in Drosophila and mammals." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(8): 3438-42.
367. Warth, R. and J. Barhanin (2002). "The multifaceted phenotype of the knockout mouse for the KCNE1 potassium channel gene." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **282**(3): R639-48.
368. Warth, R., H. Barriere, P. Meneton, M. Bloch, J. Thomas, M. Tauc, D. Heitzmann, E. Romeo, F. Verrey, R. Mengual, N. Guy, S. Bendahhou, F. Lesage, P. Poujeol and J. Barhanin (2004). "Proximal renal tubular acidosis in TASK2 K<sup>+</sup> channel-deficient mice reveals a mechanism for stabilizing bicarbonate transport." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(21): 8215-20.
369. Washburn, C. P., J. E. Sirois, E. M. Talley, P. G. Guyenet and D. A. Bayliss (2002). "Serotonergic raphe neurons express TASK channel transcripts and a TASK-like pH- and halothane-sensitive K<sup>+</sup> conductance." J Neurosci **22**(4): 1256-65.
370. Watkins, C. S. and A. Mathie (1996). "Effects on K<sup>+</sup> currents in rat cerebellar granule neurones of a membrane-permeable analogue of the calcium chelator BAPTA." Br J Pharmacol **118**(7): 1772-8.
371. Welling, P. A. (1997). "Primary structure and functional expression of a cortical collecting duct Kir channel." Am J Physiol **273**(5 Pt 2): F825-36.
372. Weng, J., Y. Cao, N. Moss and M. Zhou (2006). "Modulation of voltage-dependent Shaker family potassium channels by an aldo-keto reductase." J Biol Chem **281**(22): 15194-200.
373. Wickenden, A. (2002). "K(+) channels as therapeutic drug targets." Pharmacol Ther **94**(1-2): 157-82.
374. Wickman, K., C. Karschin, A. Karschin, M. R. Picciotto and D. E. Clapham (2000). "Brain localization and behavioral impact of the G-protein-gated K<sup>+</sup> channel subunit GIRK4." J Neurosci **20**(15): 5608-15.
375. Wickman, K., J. Nemec, S. J. Gendler and D. E. Clapham (1998). "Abnormal heart rate regulation in GIRK4 knockout mice." Neuron **20**(1): 103-14.
376. Wickman, K. D. and D. E. Clapham (1995). "G-protein regulation of ion channels." Curr Opin Neurobiol **5**(3): 278-85.
377. Xia, X., B. Hirschberg, S. Smolik, M. Forte and J. P. Adelman (1998). "dSlo interacting protein 1, a novel protein that interacts with large-conductance calcium-activated potassium channels." J Neurosci **18**(7): 2360-9.
378. Xia, X. M., B. Fakler, A. Rivard, G. Wayman, T. Johnson-Pais, J. E. Keen, T. Ishii, B. Hirschberg, C. T. Bond, S. Lutsenko, J. Maylie and J. P. Adelman (1998). "Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels." Nature **395**(6701): 503-7.





379. Xian Tao, L., V. Dyachenko, M. Zuzarte, C. Putzke, R. Preisig-Muller, G. Isenberg and J. Daut (2006). "The stretch-activated potassium channel TREK-1 in rat cardiac ventricular muscle." *Cardiovasc Res* **69**(1): 86-97.
380. Xu, J., W. Yu, J. M. Wright, R. W. Raab and M. Li (1998). "Distinct functional stoichiometry of potassium channel beta subunits." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(4): 1846-51.
381. Yamanaka, A., C. T. Beuckmann, J. T. Willie, J. Hara, N. Tsujino, M. Mieda, M. Tominaga, K. Yagami, F. Sugiyama, K. Goto, M. Yanagisawa and T. Sakurai (2003). "Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice." *Neuron* **38**(5): 701-13.
382. Yang, C. R., J. K. Seamans and N. Gorelova (1996). "Electrophysiological and morphological properties of layers V-VI principal pyramidal cells in rat prefrontal cortex in vitro." *J Neurosci* **16**(5): 1904-21.
383. Yoo, D., T. P. Flagg, O. Olsen, V. Raghuram, J. K. Foskett and P. A. Welling (2004). "Assembly and trafficking of a multiprotein ROMK (Kir 1.1) channel complex by PDZ interactions." *J Biol Chem* **279**(8): 6863-73.
384. Yost, C. S., I. Oh, E. I. Eger, 2nd and J. M. Sonner (2008). "Knockout of the gene encoding the K(2P) channel KCNK7 does not alter volatile anesthetic sensitivity." *Behav Brain Res* **193**(2): 192-6.
385. Yun, C. C., M. Palmada, H. M. Embark, O. Fedorenko, Y. Feng, G. Henke, I. Setiawan, C. Boehmer, E. J. Weinman, S. Sandrasagra, C. Korbmacher, P. Cohen, D. Pearce and F. Lang (2002). "The serum and glucocorticoid-inducible kinase SGK1 and the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange regulating factor NHERF2 synergize to stimulate the renal outer medullary K<sup>+</sup> channel ROMK1." *J Am Soc Nephrol* **13**(12): 2823-30.
386. Zerangue, N., B. Schwappach, Y. N. Jan and L. Y. Jan (1999). "A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels." *Neuron* **22**(3): 537-48.
387. Zhang, M., M. Jiang and G. N. Tseng (2001). "minK-related peptide 1 associates with Kv4.2 and modulates its gating function: potential role as beta subunit of cardiac transient outward channel?" *Circ Res* **88**(10): 1012-9.
388. Zhang, Q., M. A. Pacheco and C. A. Doupnik (2002). "Gating properties of GIRK channels activated by Galpha(o)- and Galpha(i)-coupled muscarinic m2 receptors in Xenopus oocytes: the role of receptor precoupling in RGS modulation." *J Physiol* **545**(Pt 2): 355-73.
389. Zhou, M., G. Xu, M. Xie, X. Zhang, G. P. Schools, L. Ma, H. K. Kimelberg and H. Chen (2009). "TWIK-1 and TREK-1 are potassium channels contributing significantly to astrocyte passive conductance in rat hippocampal slices." *J Neurosci* **29**(26): 8551-64.
390. Zhou, X. L., B. Vaillant, S. H. Loukin, C. Kung and Y. Saimi (1995). "YKC1 encodes the depolarization-activated K<sup>+</sup> channel in the plasma membrane of yeast." *FEBS Lett* **373**(2): 170-6.
391. Zhou, Y., H. Fei and I. B. Levitan (2003). "An interaction domain in Slob necessary for its binding to the slowpoke calcium-dependent potassium channel." *Neuropharmacology* **45**(6): 714-9.
392. Zhou, Y., J. H. Morais-Cabral, A. Kaufman and R. MacKinnon (2001). "Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K<sup>+</sup> channel-Fab complex at 2.0 Å resolution." *Nature* **414**(6859): 43-8.



- 393. Zito, K., R. D. Fetter, C. S. Goodman and E. Y. Isacoff (1997). "Synaptic clustering of Fascilin II and Shaker: essential targeting sequences and role of Dlg." Neuron **19**(5): 1007-16.
- 394. Zuzarte, M., K. Heusser, V. Renigunta, G. Schlichthorl, S. Rinne, E. Wischmeyer, J. Daut, B. Schwappach and R. Preisig-Muller (2009). "Intracellular traffic of the K<sup>+</sup> channels TASK-1 and TASK-3: role of N- and C-terminal sorting signals and interaction with 14-3-3 proteins." J Physiol **587**(Pt 5): 929-52.
- 395. Zuzarte, M., S. Rinne, G. Schlichthorl, A. Schubert, J. Daut and R. Preisig-Muller (2007). "A di-acidic sequence motif enhances the surface expression of the potassium channel TASK-3." Traffic **8**(8): 1093-100.





# Résumé

Les canaux potassiques forment la classe de canaux ioniques dont la diversité structurale et fonctionnelle est la plus grande. D'une manière générale les canaux potassiques sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques : conduction nerveuse, contraction musculaire, libération de neurotransmetteurs et d'hormones. Trois grandes familles de canaux potassiques ont été identifiées : les canaux à six segments transmembranaires et un domaine P, les canaux à deux segments transmembranaires et une boucle P et les canaux possédant quatre segments transmembranaires et deux boucles P. Cette dernière famille de canaux potassiques, appelée  $K_{2P}$  est la dernière qui a été décrite. Ces canaux génèrent des courants dits « de fond » qui participent à l'établissement et au maintien du potentiel de repos des cellules ainsi qu'à la phase de repolarisation des potentiels d'action. La famille des  $K_{2P}$  possède 15 membres et l'étude des souris invalidées pour certains gènes codant ces canaux ont permis de mieux comprendre certaines de leurs implications physiologiques, notamment dans l'excitabilité cellulaire et en particulier les épilepsies, l'anesthésie, la neuroprotection ou encore la dépression.

Une étude approfondie des mécanismes régulant l'activité de ces canaux est nécessaire afin de mieux comprendre leurs rôles et préciser leur intérêt en tant que cibles thérapeutiques.

Nous avons dans un premier temps étudié l'environnement protéique du canal TREK1, appartenant à la famille des  $K_{2P}$ , et nous avons montré l'existence d'une interaction entre le canal et une protéine cytosolique associée aux microtubules Mtap2. Cette association augmente l'expression du canal au niveau de la membrane plasmique sans en modifier les paramètres biophysiques. Cette protéine est la seconde protéine associée à TREK1 décrite. AKAP150, une protéine d'échafaudage s'associe à ce canal et en modifie drastiquement les caractéristiques électrophysiologiques. Ces deux protéines sont capables de se fixer simultanément sur le canal et d'additionner leurs effets plaçant ainsi le canal au cœur d'un complexe multiprotéique. Ces résultats montrent combien l'environnement protéique des canaux est important pour leur activité.

Nous avons également étudié les éléments régulateurs du trafic particulier du canal TWIK1. Nous avons montré que la sumoylation n'était pas responsable d'une faible expression fonctionnelle, comme cela avait été suggéré il y a quelques années. Nous avons en revanche apporté la preuve que le canal TWIK1 est localisé dans un compartiment subapical, très proche de la membrane plasmique. Le canal est en fait inséré dans la membrane plasmique, mais très vite internalisé par un mécanisme actif dépendant de la dynamine et envoyé dans les endosomes de recyclage. La sortie de ce compartiment et l'insertion à la membrane plasmique est déclenchée par l'activation de récepteurs couplés à la protéine  $G_i$  : 5-HT<sub>1</sub>R, récepteur à la sérotonine ou  $\alpha$ 2A-AR, récepteur à l'adrénaline. Cette activation serait le signal physiologique permettant d'accroître la quantité de canaux TWIK1 à la membrane plasmique. A notre connaissance, il s'agit d'un mécanisme original de régulation de l'excitabilité cellulaire impliquant le contrôle de l'expression d'un canal potassique de fond par une voie  $G_i$ -dépendante.